

乳酸菌DNAモチーフによるアレルギー発症防御機構 の解明と戦略的予防食品の開発

著者	北澤 春樹
URL	http://hdl.handle.net/10097/39749



**乳酸菌 DNA モチーフによるアレルギー発症防御機構の解明と
戦略的予防食品の開発**

(研究課題番号 15380183)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金（基盤研究(B)）

研究成果報告書

平成19年 3月

研究代表者 北 澤 春 樹

(東北大学大学院農学研究科・助教授)

乳酸菌 DNA モチーフによるアレルギー発症防御機構の解明と
戦略的予防食品の開発

(研究課題番号 15380183)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（B）(c)）
研究成果報告書

平成19年 3月

研究代表者 北 澤 春 樹
(東北大学大学院農学研究科・助教授)

目 次

	ページ
【1】研究組織と研究経費	1
【2】研究発表	2
1) 学会誌等	
2) 口頭発表	
3) 総説	
4) 記事	
5) 特許	
6) 商品開発	
【3】研究成果	
1) 研究目的	10
2) 研究実施計画	14
3) 研究成績	15
4) まとめ	76
5) 参考論文	81
【4】研究成果公表論文等	
1) 原著論文	89
2) 総説	224
3) 学会発表・招待講演	284
4) 報道	316
5) 特許	319
6) 商品開発	358

【1】研究組織と研究経費

[研究組織]

研究代表者：北澤春樹（東北大学大学院農学研究科・助教授）

研究分担者：齋藤忠夫（東北大学大学院農学研究科・教授）

研究分担者：川井泰（東北大学大学院農学研究科・助手）

[研究経費]

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	6,600	0	6,600
平成16年度	4,500	0	4,500
平成17年度	3,100	0	3,100
平成18年度*	1,600	0	1,600
総計	15,800	0	15,800

* 研究計画最終年度前年度採択により辞退

【2】研 究 発 表

1) 原 著 論 文

1. Katoh, S., H. Kitazawa, T. Shimosato, M. Tohno, Y. Kawai, T. Saito; Cloning and characterization of swine Interleukin-17, preferentially expressed in the intestines. *J. Interferon Cytokine Res.*, 24, 553-559 (2004).
2. Shimosato, T., H. Kitazawa, M. Tohno, S. Katoh, Y. Kawai and T. Saito; Development of immune assay system for both CpG and non-CpG DNA from lactic acid bacteria using a transfectant of swine Toll-like receptor 9. *Anim. Sci. J.*, 75, 377-382 (2004).
3. Shimosato, T., H. Kitazawa, S. Katoh, M. Tohno, I.D. Iliev, C. Nagasawa, T. Kimura, Y. Kawai and T. Saito; Augmentation of TH-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326, 782-787 (2005).
4. Iliev, I.D., H. Kitazawa, T. Shimosato, S. Katoh, H. Morita, F. He, M. Hosoda and T. Saito; Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cellular Microbiology*, 7, 403-414 (2005).
5. Shimosato, T., M. Tohno, H. Kitazawa, S. Katoh, K. Watanabe, Y. Kawai, H. Aso, T. Yamaguchi and T. Saito; Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol. Lett.*, 98, 833-89 (2005).
6. Tohno, M., T. Shimosato, H. Kitazawa, S. Katoh, I. D. Iliev, T. Kimura, Y. Kawai, K. Watanabe, H. Aso, T. Yamaguchi and T. Saito; Toll-like receptor

2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330, 547–554 (2005).

7. Tohno, M., H. Kitazawa, T. Shimosato, M. Matsumoto, S. Katoh, Y. Kawai and T. Saito; A swine Toll-like receptor 2-expressing transfectant as a potential primary screening system for immunobiotic microorganisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 44, 283–288 (2005).

8. Shimosato, T., T. Kimura, M. Tohno, I.D. Iliev, S. Katoh, Y. Ito, Y. Kawai, T. Sasaki, T. Saito and H. Kitazawa; Strong immunostimulatory activity of AToligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cellular Microbiology*, 8, 485–495 (2006).

9. Takahashi, N., H. Kitazawa, T. Shimosato, N. Iwabuchi, J.Z. Xiao, K. Iwatsuki, S. Kokubo and T. Saito; An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 46, 461–469 (2006).

10. Takahashi, N., H. Kitazawa, N. Iwabuchi, J. Z. Xiao, K. Miyaji, K. Iwatsuki and T. Saito; Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model. *Clin. Exp. Immunol.*, 145, 130–138 (2006).

11. Takahashi, N., H. Kitazawa, N. Iwabuchi, J. Z. Xiao, K. Miyaji, K. Iwatsuki and T. Saito; Oral administration of an immunostimulatory DNA sequence from *Bifidobacterium longum* improves Th1/Th2 balance in a murine model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2013–2017 (2006).

12. Tohno, M., T. Shimosato, M. Mouea, H. Aso, K. Watanabe, Y. Kawai, T.

Yamaguchi, T. Saito and H. Kitazawa; Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. *Vet. Res.*, 37, 791-812 (2006).

13. Tohno, M., T. Shimazu, W. Ueda, D. Anzawa, H. Aso, J. Nishimura, Y. Kawai, Y. Saito, T. Saito and H. Kitazawa; Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Mol. Immunol.*, 44, 2566-2577 (2007).

14. Tohno, M., T. Shimosato, Y. Kawai, H. Aso, S. Ikegami, N. Taketomo, T. Saito and H. Kitazawa; An advanced molecular immunoassay system for immunobiotic lactic acid bacteria using a transfectant of Toll-like receptor 2. *Anim. Sci. J.*, 78, 195-205 (2007).

2) 総 説

1. Kitazawa, H., T. Shimosato, M. Tohno and T. Saito; Immunostimulatory activities of Lactic acid bacteria via Toll-like receptors. *Jpn. J. Lactic acid bacteria*, 16, 11-20 (2005).

2. 下里剛士, 北澤春樹, 齋藤忠夫; Toll様受容体9を介するイムノバイオティック乳酸菌 DNA の免疫活性とその将来性. *ミルクサイエンス*, 54, 9-15 (2005).

3. 北澤春樹, 齋藤忠夫; プロバイオティック乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG株由来ゲノムDNAからの新規免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチドの発見. *食品工業*, 48, 20-29 (2005).

4. 齋藤忠夫, 北澤春樹; 乳酸菌のイムノジェニックス研究の最近の動向. *乳*

業技術, 55, 34-44 (2005).

5. 北澤春樹, 齋藤忠夫; プロバイオティクスの生物活性因子. 化学療法の領域, 21, 25-32 (2005).

6. 北澤春樹; Toll 様受容体 (TLR) 9 のリガンド構造に新知見. 化学と生物, 43, 775-778 (2005).

7. Kitazawa, H., T. Shimosato, M. Tohno and T. Saito; Swine intestinal immunity via Toll-like Receptors and its advanced application to food immunology. *Journal of Integrated Field Science*, 3, 9-14 (2006).

8. 北澤春樹, 遠野雅徳, 下里剛士, 齋藤忠夫; 豚腸管における Toll 様受容体の機能発現と食品免疫学への応用. 獣医畜産新報, 59, 559-561 (2006).

3) 口 頭 発 表

[学会発表 国内]

1. 下里剛士, 北澤春樹, 加藤真一郎, 遠野雅徳, 永沢千穂, 木村俊朗, 川井 泰, 齋藤忠夫; 免疫活性 AT オリゴヌクレオチドの Toll 様受容体 9 を介する Th-1 系免疫応答の誘導 日本畜産学会 第 104 回大会 講演要旨集, p.175, 2005.

2. 木村俊朗, 北澤春樹, 下里剛士, 伊藤喜之, 加藤真一郎, 遠野雅徳, 永沢千穂, 川井泰, 佐々木隆, 齋藤忠夫; 新規免疫活性 AT オリゴヌクレオチドの *Lactobacillus gasseri* OLL2716 ゲノム DNA からの探索 日本畜産学会 第 104 回大会 講演要旨集, p.175, 2005.

3. 遠野雅徳, 北澤春樹, 下里剛士, 加藤真一郎, 木村俊朗, 川井泰, 渡邊康一, 麻生久, 山口高弘, 齋藤忠夫; ヒトモデルとしてのブタ腸管関連リンパ組

織における Toll-like receptor (TLR) 2 の発現解析 日本畜産学会 第 104 回大会 講演要旨集, p.175, 2005.

4. 高橋典俊, 北澤春樹, 岩淵紀介, 清水(肖)金忠, 岩附慧二, 小久保貞之, 齋藤忠夫; *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム由来 ISS-ODN の抗アレルギー作用, 2005 年度 日本乳酸菌学会大会, 東京, 2005.

5. Iliyan Iliev, Haruki Kitazawa, Takeshi Shimosato, Shinichiro Katoh, Hirotugu Morita, He Fang, Masataka Hosoda, Yasushi Kawai and Tadao Saito; Novel oligodeoxynucleotide in the genomic DNA of *Lactobacillus rhamnosus* GG elicits strong immunostimulation. 日本農芸化学会 2005 年度大会 講演要旨集, p.112, 札幌, 2005 (学会トピックスに採択).

6. 下里剛士, 北澤春樹, 遠野雅徳, 伊藤喜之, 川井泰, 佐々木隆, 齋藤忠夫; プロバイオテック乳酸菌由来, 新規免疫刺激性 DNA の Toll 様受容体 9 を介する Th-1 系免疫応答の誘導とその構造特性. 日本食品免疫学会 第 1 回学術集会, 東京, 2005.

7. 遠野雅徳, 北澤春樹, 下里剛士, 川井泰, 渡邊康一, 麻生久, 山口高弘, 齋藤忠夫; ヒトモデルとしてのブタ腸管関連リンパ組織における Toll 様受容体 2 および 9 の発現解析. 日本食品免疫学会 第 1 回学術集会, 東京, 2005.

8. 遠野雅徳, 北澤春樹; ブタ腸管関連リンパ組織における Toll-like receptor (TLR) 2 および 9 の発現とその機能解析. 第 141 回日本獣医学会学術集会, 講演要旨集, p. 226, つくば, 2006. (ベストポスター賞受賞).

9. 馬上真之, 遠野雅徳, 下里剛士, 麻生久, 川井泰, 齋藤忠夫, 北澤春樹; ブタ腸管上皮細胞 (PIE) における Toll 様受容体 (TLR) ファミリーの機構発現. 日本畜産学会 第 106 回大会 講演要旨集, p. 146, 2006.

10. 遠野雅徳, 下里剛士, 川井泰, 齋藤忠夫, 池上秀二, 北澤春樹; プロバイオティクスを認識するブタ TLR2 強制発現細胞による新規分子免疫評価系の構築. 日本畜産学会 第 106 回大会 講演要旨集, p. 9, 2006. (優秀発表賞受賞)

[学会発表 海外]

1. Kitazawa H., T. Shimosato, S. Katoh, M. Tohno, Y. Kawai and T. Saito; Immunostimulatory activities of a novel AT oligonucleotide from "Immunobiotic" *Lactobacillus gasser* on swine peyer's patch cells. ADSA-ASAS-PSA Joint Meeting, St. Louis, MO, USA, 2004.

2. Shimosato T., H. Kitazawa, M. Tohno, S. Katoh, Y. Kawai and T. Saito; AT oligonucleotide from "Immunobiotic" *Lactobacillus gasser* augments immune response via Toll-like receptor 9 signaling. ADSA-ASAS-PSA Joint Meeting, St. Louis, MO, USA, 2004.

3. Tohno M., T. Shimosato, Y. Kawai, T. Saito and H. Kitazawa; Development of a novel immunoassay system for immunobiotics that modulate intestinal immunity through Toll-like receptor 2. ADSA-ASAS joint meeting, Minneapolis, MN, USA, 2006. (Graduate student competition, finalist)

4. Kitazawa H., M. Tohno, T. Shimosato, Y. Kawai, and T. Saito; Immunobiotic lactic acid bacteria induce immune responses in immature gut-associated lymphoid tissues via Toll-like receptors 2 and 9. ADSA-ASAS joint meeting, Minneapolis, MN, USA, 2006.

[招待講演]

1. 北澤春樹, 齋藤忠夫; イムノバイオティック乳酸菌の Toll 様受容体を介する腸管免疫調節機構の解明. 日本乳酸菌学会 2004 年度大会シンポジウム, 仙台, 2004 年 7 月 9 日.

2. 齋藤忠夫；プロバイオティクスの示す持続的免疫修飾性、抗菌性および乳糖分解性発現に重要な腸管付着性. 日本食品免疫学会 第2回学術大会シンポジウム, 東京, 2005年11月9日.

3. Kitazawa, H., T. Shimosato, M. Tohno and T. Saito; Swine intestinal immunity via Toll-like receptors and its advanced application to Food immunology. Session A. Immunology and animal disease control, International Symposium on Recent Advances in Animal Science, Sendai, Nov. 17, 2005.

4. 北澤春樹；イムノバイオティクスからの新規免疫刺激性 DNA の発見と分子免疫評価システムの構築, 第171回酵母細胞研究会例会, 千葉, 2005年11月25日.

5. Kitazawa, H.; Immune responses of Immunobiotics and Immunogenics via Toll-like receptors and their advanced application to Food immunology. 2nd International Bio-microcosmos Workshop, Sapporo, Feb. 2, 2006.

6. 北澤春樹；パターン認識受容体を介したイムノバイオティクスによる腸管免疫調節機構, 第141回日本獣医学会学術集会 微生物学分科会 シンポジウム「異物認識の多様性と微生物感染」, 講演要旨集, p.145, つくば, 2006年3月21日.

7. 北澤春樹；イムノバイオティクスからの新規免疫調節因子の発見とその分子免疫評価系の構築, 日本畜産学会賞受賞講演, 講演要旨集, p.3, 福岡, 2006年3月29日.

4) 報 道

1. 「◆農芸化学会◆森永乳業、BB536 菌の抗アレルギー活性本体を発表」日経

バイオテクホームページ(2005 年 3 月 30 日).

2.「東北大齋藤教授ら、乳酸菌の TLR 刺激 DNA 配列を森乳 BB536、タカナシ LGG、明乳 LG21 で確認」日経バイオテクホームページ(2005 年 11 月 15 日).

5) 特 許

1. 免疫賦活剤 (特開2006-232790)

2. AT オリゴヌクレオチドを有効成分とする免疫応答増強性薬剤及び食品成分
(特開 2006-223110)

3. オリゴデオキシヌクレオチドおよびこれを利用する免疫修飾剤
(特開 2006-325540)

6) 商品開発

1. 抗ブタToll-like receptor 2ポリクローナル抗体

2. 抗ブタ Toll-like receptor 9 ポリクローナル抗体

【3】研 究 成 果

1) 研 究 目 的

食品は人間の生命維持や活動に必要なエネルギー源を獲得するための物質である。これはいわゆる食品としての一次機能（栄養素）であるが、文化の成熟が進むにつれて、ヒトは食品に美味しさを求めるようになった。これが食品の二次機能（嗜好性）である。さらに、第二次大戦後、日本では高度成長期に入ってから、食品に対して体に良いものを求める嗜好が出現し始め、1980年代からいわゆる機能性食品が市場に出現することになる。これら食品が訴求するのが食品の三次機能（生体調節機能）である [1]。登場初期には様々な生体調節機能を謳った機能性食品が市場に氾濫していたが、1992年に特定保健用食品制度が発足し、いわば国のお墨付きの機能性食品が出現した [2]。2006年6月15日現在、その認可数は587食品にも及ぶ。その中でも、最も認可数の多いヘルスクレームが「整腸作用」に関するものであり、その代表的食品が発酵乳である。

発酵乳は乳酸菌による発酵により保存性を高めた伝統的食品の一つである。その起源は古く、家畜の乳を利用し始めた紀元前 3500 年～5000 年に中近東で発祥したと言われている。乳酸菌による乳の発酵は、乳にその保存性の向上だけでなく、発酵により産生される乳酸がもたらす爽やかな風味を与え、ヒトにとって有益な生理機能をも付与した。1907年にメチニコフ博士が「発酵乳の不老長寿説」[3]を提唱したことによって、発酵乳のヒトへの生理機能は大きく注目されるようになり、ここ 10 数年間に発酵乳もしくはそれに使用される乳酸菌の保健機能 [4] は、前述の整腸作用以外にも数多くが、*in vitro* 実験系や動物への経口投与試験、ならびにヒト臨床試験で検証され、実験的確認（エビデンス）が蓄積されつつある。近年では世界各国において、*bifidobacteria* のようなヒト腸管由来の菌種を使用した発酵乳が盛んに開発・販売されている。

これらは、乳酸菌や *bifidobacteria* の機能に着目して開発された製品である。ヒトに有益な生理作用をもたらす微生物は probiotics (プロバイオティクス) [5] と呼ばれ、発酵乳に使用される乳酸菌や *bifidobacteria* はその代名詞となっている。probiotics は現在では「適正量を摂取した際に宿主に有益な作用を示す生菌」と定義されている [6]。probiotics は、免疫調節作用が最も研究されている食品成分の一つである。近年、自然免疫系が外来微生物の構成成分を認識し、獲得免疫系へ影響を及ぼしていることが明らかにされたことにより、probiotics を介したヒトの免疫調節作用への応用が期待されている。

現在、日本におけるアレルギー性疾患の有病率は 38% であり、最も頻度の高い生活習慣関連病と認識されている。とくにスギ花粉症は IgE が関与する I 型アレルギーで、日本人の約 20% が罹患し、今や深刻な社会問題とさえなりつつある。現在まで、これらアレルギー疾患のはっきりとした原因は解明されていないが、アレルギー疾患の増加している先進工業国においては、環境微生物からの免疫系への刺激の減少が、アレルギー急増の原因と推測されている (衛生仮説 [7])。通常、新生児の免疫系は Helper T 細胞の中でも Th2 細胞が優勢であり、生後様々な病原微生物および正常な腸内細菌叢により適切な刺激を受けて Th1 細胞が次第に発達し、Th1/Th2 のバランスのとれた免疫系が完成すると考えられる。もし過度の衛生状態に置かれ微生物による刺激が不十分であれば Th2 過剰のままとなり、結果的にアレルギーになりやすくなってしまうという理論が衛生仮説であり、多くの裏付けとなる報告がなされている。腸内細菌とアレルギー発症の関連については多くの研究が行われており、北欧での疫学調査からアレルギーを有する 2 歳児の腸内菌叢には *bifidobacteria* や乳酸桿菌が少ないことおよび *Clostridium* や *Staphylococcus aureus* が多いことが示されている [8]。また、母乳栄養児は調製粉乳摂取児と比べ *bifidobacteria* が多く、*Clostridium* が少ないと報告されている [9]。このよ

うな知見に基づき、probiotics によるアレルギーの予防および治療のアプローチが行われてきた。

probiotics 摂取によるアレルギーの予防および治療効果は、Majamaa らが行った試験から示唆された [10]。その後、*Lactobacillus rhamnosus* GG によるアトピー性皮膚炎の予防効果が Kalliomäki らによって示された [11]。この研究結果がきっかけとなり、世界中において probiotics によるアレルギーの予防および治療効果が検討され始めた。日本においては、アレルギー疾患の中でも、とくにスギ花粉症に対する作用が中心に研究されている。榎本らは、*Enterococcus faecalis* FK-23 の抽出物摂取によるスギ花粉症の有意な症状改善を報告した [12]。また、同様のスギ花粉症改善作用は、*Lactobacillus acidophilus* L-92 や *Lactobacillus paracasei* KW3110 においても報告されている [13, 14]。現在、probiotics による免疫調節作用は (1) 菌体成分による腸管粘膜に対する直接的な刺激および、(2) probiotics の持つ高い整腸効果により腸内細菌叢を改善することによる間接的な効果が寄与していると考えられている。以上のヒト臨床試験での作用機序を探るべく、数多くの probiotics を用いて *in vitro* 実験や動物実験における検討がなされている。これまでの報告によると、probiotics は、Th1 cytokine を誘導し、Th2 cytokine や IgE 産生を抑制する [15-18]。また、腸管粘膜の浸透性に対する影響や、probiotics の摂取によっていわゆる悪玉菌である *Bacteroides fragilis* group の増加抑制により腸内細菌叢が影響を受けることも明らかにされている [19]。

probiotics は食品として摂取されるため、その作用は腸管関連リンパ組織 (GALT: gut associated lymphoid tissue) を介して発揮されると推測されている [20] が、現時点では、probiotics がどういった機序で GALT を通じて全身的な免疫状態に影響を及ぼしているのか不明な点が多い。probiotics の抗

アレルギー作用の作用機序を明らかにするためには、基礎的知見として、probiotics の菌体成分が示す免疫調節作用を解明して行く必要がある。免疫調節作用に関する probiotics の菌体成分として、ペプチドグリカンやリポテイコ酸等の細胞壁成分、および菌体外多糖成分がその活性因子として報告されてきた [21-23]。1995 年に Krieg らにより大腸菌ゲノム DNA 中の特異的配列 (CpG motif) が直接 B リンパ球を刺激することが報告 [24] され、probiotics においてもその DNA 成分の生理活性がクローズアップされた。CpG motif は、B リンパ球の増殖誘導、NK 細胞の溶菌活性の増大や、各種疾病に対するアジュバント的役割等、様々な免疫調節作用を有することが明らかとなっている [25]。また、CpG motif のレセプターとされる Toll-like receptor (TLR) 9 は、樹状細胞などの自然免疫担当細胞上に発現しており、細菌のゲノムに見られる非メチル化 DNA を認識する。このことは、probiotics のゲノム DNA 成分が自然免疫を介して、免疫調節作用を発揮する可能性を示唆するものであり、また、食品として摂取した probiotics の免疫調節作用をも期待させるものである。事実、probiotics の中でも、乳酸桿菌のゲノム DNA が大腸菌ゲノム DNA と同様に B リンパ球を刺激することが明らかにされた [26]。また、その DNA から幾つかの免疫刺激性配列 (immunostimulatory sequence: ISS) も Kitazawa らによって同定され、それらは Th1 cytokine である IFN- γ や IL-12 を誘導することが示されている [27-29]。しかしながら、ヒトの大腸フローラにおける、いわゆる善玉菌の最優勢菌種である bifidobacteria のゲノム DNA 成分に関する免疫刺激性の報告はこれまでに無かった。

本研究では probiotics の中でもとくに高い整腸作用を持つ bifidobacteria に着目し、bifidobacteria を用いた抗アレルギー作用を示す新規な発酵乳の創出を目指し、その開発基盤となる基礎的知見を得るために、bifidobacteria における DNA 成分の免疫調節作用を明らかにすることを研究の目的とし、具体

的には以下の研究を遂行した。すなわち、*Bifidobacterium longum* BB536 のゲノム DNA より免疫刺激性配列の同定を試み、その同定した免疫刺激性配列の抗アレルギー作用の検討を *in vitro* および *in vivo* レベルで行った。

アレルギー疾患は現在のところ根治療法は確立しておらず、対症療法として抗ヒスタミン剤や合成ステロイド等が用いられる。probiotics によるアレルギー症状改善作用は、薬剤のように症状を抑えられるようなものではないが、これまでの報告によれば、毎日摂取することによってアレルギー症状の抑制効果が期待できるものと言える。和歌山県での中学生のアレルギーに関する疫学調査では、発酵乳摂取習慣の有無により、血清総 IgE 値およびアレルギー発症頻度に有意な低下が見出されている [30]。この調査結果は、probiotics を主とする発酵乳の摂取が、アレルギー発症に対して重要な抑制因子の一つであることを示唆するものである。本研究で取り組んだ、probiotics の菌体構成成分である DNA 成分の免疫調節作用を明らかにすることは、これまで不明であった probiotics の抗アレルギー作用における作用機序を、物質論的に論じることの出来る研究レベルまで高めることが期待されるものである。

2) 研究実施計画

本研究は、これまでの知見を基礎とし、乳酸菌およびビフィズス菌 DNA の消化管免疫を介するアレルギー発症防御機構を解明し、乳酸菌およびビフィズス菌 DNA による新規機能性食品“アレルギー発症予防ヨーグルト”の創製を目指した、戦略的基礎研究を行うことを目的とする。

[平成15年度]

1. Toll 様レセプター9 発現細胞の構築
2. Toll 様レセプター9 発現細胞を用いた乳酸菌 DNA の活性評価系の構築

3. *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム DNA からの免疫刺激性オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) 配列の決定

[平成 16 年度]

1. 免疫刺激性 ODN の Th1/Th2 サイトカイン転写活性制御機構の解析
2. 免疫刺激性 ODN によるアレルギー発症防御関連サイトカインの誘導解析

[平成 17 年度]

1. 免疫刺激性 ODN の *in vitro* における抗アレルギー作用の検討
2. 免疫刺激性 ODN の *in vivo* における抗アレルギー作用の検討

3) 研 究 成 績

1. 材料および方法

1-1) 試薬

本実験においては、断りの無い限り、和光純薬工業（株）社製の特級または 1 級試薬を使用した。また、水は全てミリ Q 水を使用した。

1-2) 実験動物

Specific pathogen free (SPF) BALB/c マウス（雄）は日本 SLC (Japan) より 5 週齢の雄を購入し、F1 飼料（船橋農場, Japan）および水道水を自由摂取させ、予備飼育を行った。実験には 6 週~8 週齢の個体を用いた。

なお、本章における全ての動物実験は、「実験動物の飼養および保管等に関する基準」（昭和 55 年総理府告示第 6 章）を遵守し、実施した。

1-3) *Bifidobacterium longum* BB536 の培養と継代

Bifidobacterium longum BB536 は、森永乳業株式会社栄養科学研究所保管株であり、分離源は成人ヒト糞便である。BB536 は Tanaka らの報告 [31] にある Briggs-Liver broth を使用し、3%接種 (v/v) にて 37°C、16 時間の条件にて継代培養を行い維持した。

1-4) *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム DNA の調製

Bifidobacterium longum BB536 の培養菌体を遠心分離 (8,000 g, 10 分, 4°C) にて集菌し、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) を使用して 2 回同遠心分離条件での遠心洗浄を実施した。菌体の酵素処理は次の通り行った。菌体 20 mg 当り、QIAGEN RNase 10 μ l、Lysozyme 8 mg および *N*-acetylmuramidase SG 0.5 mg (生化学工業, Japan) を 5 ml の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) 中で、37°C 2 時間保持後、100 μ l の QIAGEN Proteinase K を添加し、さらに 16 時間 37°C にて保持した。酵素処理液からのゲノム DNA 精製は、QIAGEN Genomic-tip を使用し、QIAGEN Genomic DNA protocol に従い実施した。得られたゲノム DNA は 50 μ g/ml となるように TE buffer (10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) に溶解し、直ちに次の実験に供した。

1-5) *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム DNA からの免疫刺激性配列の決定

1- 5-1) *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム DNA からのエンドトキシン除去

Bifidobacterium longum BB536 のゲノム DNA 溶解液の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液を添加し、さらにその 3%量 (v/v) の Triton X-114 を添加し攪拌後、アイスバス上で 5 分間保持した。この間 1 分毎に攪拌した。56°C のヒートブロック上で 5 分間保持後、Triton X-114 を析出させ、その後、37°C で 17,000 g、1 分間遠心分離した。4°C に冷却、攪拌後、再度 56°C のヒートブロック上

で5分間保持し17,000 g、10分間遠心分離した。上層をマイクロピペットで下層を乱さないように集め、2倍量 (v/v) の100 %エタノールを添加後、-80℃で30分間保持した。4℃にて17,000 g、10分間遠心分離した後、上清を捨て、70 %エタノールで2回遠心洗浄した。上清を捨て減圧乾燥後、500 μ g/ml となるよう endotoxin-free 蒸留水（大塚蒸留水, Japan）を加え、-20℃で凍結保存した。

1-5-2) *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム DNA の制限酵素処理

ゲノム DNA 1 μ g 当り 3 unit の *Sau*3AI (Takara Bio, Japan) を反応させ、*Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム DNA の完全消化を実施した。反応条件は、酵素付属の 10 \times H buffer を使用し、この buffer および *Sau*3AI の各容量が反応系の 1/10 以下となるように蒸留水を添加し、37℃16 時間反応させた。反応後、一部の反応液をアガロース電気泳動に供し、その消化を確認した。

制限酵素処理したゲノム DNA の電気泳動は、1.5%および2.5%のアガロース濃度の電気泳動用ゲルを用いて実施した。泳動用緩衝液は TBE buffer (90 mM Tris-ホウ酸、2 mM EDTA、pH 8.0) を用い、分子量マーカーとして 1 kbp DNA ladder (Takara Bio) を使用した。泳動装置は Mupid-2 (コスモバイオ, Japan) を用い、100V の定電圧条件下で実施し、泳動後のゲルは 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド溶液に30分間に浸して染色し、UV にて検出した。

1- 5-3) BALB/c マウス脾臓細胞の調製

BALB/c マウスより摘出した脾臓から、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む PBS に脾臓細胞を漏出させ、細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液を遠心分離 (300 g, 5 分, 4℃) 後上清を除去し、次いで eBioscience 1 \times RBC Lysis Buffer (eBioscience, USA) を 3 ml/匹になるよう

に加え、室温で 3 分間保持して赤血球を破壊した。PBS を 12 ml 加えた後、ファルコンセルストレーナー (BD 352350) を使用して凝集細胞を取り除き、遠心分離 (300 g, 5 分, 4°C) RPMI1640 培地を加え、2 回遠心洗浄 (300 g, 5 分, 4°C) 後、RPMI1640 培地を加え、トリパンブルー染色により、細胞計数用スライドグラスを用いて生細胞数を計数した。

1- 5-4) マウス脾臓細胞に対するリンパ球幼若化試験

マウス脾臓細胞を 2×10^5 cells /well になるように 2% FCS を含む RPMI1640 中に懸濁し、96 穴 U 字型マイクロプレート (住友ベークライト, Japan) に 90 μ l 播種した。調製済みのゲノム DNA 試料溶液 10 μ l を各 well に加え、37°C 48 時間、5 % CO₂ インキュベーターで培養した。20 μ g /ml LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma) および 2 μ g /ml Concanavalin A (Sigma) をそれぞれ B および T 細胞のポジティブコントロールとして使用した。0.1ml の ³H-Thymidine を 3.9 ml の RPMI1640 培地 (-FCS) に加え、40 倍に希釈し、培養終了 16 時間前に、各 well にこの溶液を 10 μ l 加え (9.25 kBq/well)、再び CO₂ インキュベーターで培養した。培養後、各ウェルの細胞をグラスファイバーフィルター (Labo Mash, Labo Science, Japan) に集め乾燥させ、専用バイアルに液体シンチレーター用カクテル (1, 4-bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzene 0.1 g および 2, 5-diphenyloxazole 4.0 g / 1L toluene) 3ml と共に加え、液体シンチレーション用カウンター (Beckman Instruments, USA) で測定した。リンパ球幼若化活性は ³H-Thymidine の取り込み量から、以下の式を用いて Stimulation Index (SI) として算出した。

$$SI = \frac{[(\text{counts/min})_{\text{in treated cells}} - (\text{counts/min})_{\text{background}}]}{[(\text{counts/min})_{\text{in control cells}} - (\text{counts/min})_{\text{background}}]}$$

1- 5-5) アガロースゲルからの DNA 抽出

アガロースゲル電気泳動、染色後のゲルからのDNA抽出は、BIO-RAD Quantum Prep Freeze N Squeeze Spin Column (Bio-Rad, USA) を用い、そのプロトコルに従って行った。すなわち、染色後の 2.5 %アガロース濃度ゲルから 500 kb 以下の部分を切り出し、切り出したスライスを細かく切り刻んだ。刻んだゲルを Spin Column のフィルターカップに入れ、フィルターカップを付属のチューブに収め、-20℃で5分間保持した。保持後直ちに11,000 *g*で3分間遠心分離し、エタノール沈殿、70%エタノールによる洗浄を行い、50 ng/ μ l となるよう蒸留水に溶解して-20℃で凍結保存した。

1- 5-6) pUC119 への Ligation 反応

Ligation 反応は、pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (Invitrogen) の一部を使用し、以下の組成により、4℃16 時間反応させることにより、実施した。終了後は直ちにトランスフォーメーションに供した。

(續)

pUC119 (50 ng/ μ l, Takara Bio)	1 μ l
DNA (50 ng/ μ l)	1 μ l
2×Rapid Ligation Buffer (Invitrogen)	5 μ l
T4 DNA Ligase (Invitrogen)	1 μ l
MiliQ	2 μ l
Total	10 μ l

1- 5-7) *Escherichia coli* JM109 への Transformation

丸底チューブに以下組成の Reaction mixture を作成し、氷上で保持しておい

(Reaction mixture)	
10 ⁷ KCM	10 μ l
(KCl 7.46 g, CaCl ₂ 3.32 g, および MgCl ₂ · 6H ₂ O 10.16 g in H ₂ O 100 ml)	
30% PEG (polyethylene glycol)	7 μ l
DNA solution (50 ng相当)	10 μ l
MiliQ	73 μ l
Total	100 μ l

た。

E. coli JM109 (100 μ l, OD 0.2~0.3) を氷中にて 10 分間保持後、JM109 をチューブに加え、軽く攪拌後、氷中で 25 分間保持し、次いで、室温で 10 分間保持した。SOC broth を 800 μ l 加え、37°C で 1 時間振とう培養した。100 μ l の X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 溶液

(20 mg/ml *N,N*-dimethylformamide) を予め塗末したアンピシリンを含む LB 平板培地にまき、37°C 16 時間培養した。白色のコロニーを釣菌し、LB (Luria-Bertani) 平板培地 (日本製薬, Japan) に画線培養し、プレート上のコロニーを滅菌楊枝で掻き取り、楊枝ごと 3ml の Terrific broth に入れ、37°C で 16 時間振とう培養した。

1- 5-8) *E. coli* JM109 からの Plasmid 抽出

Terrific broth (3ml) で増殖させた JM109 は、1 本の 1.5ml エッペンチューブで 2 回に分けて遠心集菌した。菌体を解した後、プラスミド抽出は、BIO-RAD Quantum Prep Plasmid Mini Prep Kit (Bio-Rad) を使用し、そのプロトコルに厳密に従い実施した。最終的に抽出・精製プラスミドは、TE buffer 50 μ l に溶解させ、-20°Cにて保管した。

(Terrific broth, 1000 ml)

Bacto tryptone (BD)	12 g
Bacto yeast extract (BD)	24 g
glycerol	5.04 g
250 mM KCl (1.86 g/100 ml)	20 ml
900 mlに蕨水ヌヲ後、 以不續液 100 ml加える。	121°C15分滅菌後
KH ₂ PO ₄	2.31 g
K ₂ HPO ₄	12.54 g
蒸留	100 ml

1- 5-9) Plasmid からの PCR 反応

PCR 反応には、TAKARA BIO rTaqpolymerase kit (Takara Bio) を使用し、そのプロトコルに厳密に従い実施した。すなわち、予め以下の Reaction mixture を調製した。

(Reaction mixture、1 サンプル当たり)

10 × buffer (Takara Bio)	10 μ l
2.5 mM dNTP (Takara Bio)	8 μ l
M13M4-M13RV primer (20 pmol/ μ l)	4 μ l
MiliQ	76.5 μ l

次いで、PCR 用チューブに精製 plasmid (100 ng/ μ l) を 1 μ l 入れ、4°C で保持しながら、rTaqpolymerase を 1 サンプル当たり 0.5 μ l となるように Reaction mixture に添加し、4°C で保持しながら 99 μ l を PCR 用チューブに添加後、PCR 反応をスタートした。使用した PCR cycle は以下の通り。

(PCR cycle)

95°C	300 sec	} 30cycle
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	60 sec	
4°C	∞	

反応後、一部をアガロース電気泳動に供し、PCR 産生物の有無を確認し、さらに純度を高めるため、QIAGEN QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, USA) を用いて精製し、最終的な溶解は蒸留水で行った。

また、挿入断片の塩基配列は Takara Bio Taq™ Cycle Sequencing Kit (Takara Bio) を使用して増幅後、ABI 3100-Avant Genetic Analyzer DNA sequencer

(Applied Biosystems, USA) により決定した。

1- 5-10) PCR 産物のリンパ球幼若化活性の測定

PCR 産物は 500 pmol/ml となるように蒸留水に溶解させた。また、コントロールとして、ライゲーション反応を行っていない pUC119 に対して同様の PCR 反応を行い、得られた産物は蒸留水で 500 pmol/ml 濃度に調製した。これら PCR 産物は先の条件でマウス脾臓細胞のリンパ球幼若化活性試験を実施した。SI を算出後、最終的には pUC119 単体での PCR 産物の SI 値を 1 とした相対値として示した。

1- 5-11) 免疫刺激性配列候補配列選出のための相同性解析

塩基配列の相同性解析は、GENETYX-SV/RC Version6.1.5 (Software Development, Japan) により実施した。免疫刺激性配列候補配列の選定に当たっては、CG 配列付近でとくに相同性の高いものをピックアップし、またポジティブコントロールとして用いる ODN の長さに合わせて、20mer の配列を選出した。

1- 5-12) オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の化学合成

本章で使用した ODN は全て QIAGEN に化学合成を依頼した。ODN のポジティブコントロールとしては、マウスタイプ CpG1826 (5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3') を用いた。また ODN のネガティブコントロールとしては、CpG1826 の全シトシンの 5' 位がメチル化されている CpG1826Me (5'-TCCATGAmCGTTCTGAmCGTT-3', where mC indicates 5'-methyl cytosine) を使用した。化学合成品された ODN のエンドトキシン濃度は、トキシカラースystem (生化学工業) を用い測定し、その濃度が 10 ng/mg

ODN 未満であることを確認した。

1- 5-13) J774. 1 cell からの IL-12 誘導試験

マウスマクロファージ様細胞である J774. 1 cell は、理化学研究所バイオリソースセンター（Japan）より分譲された。培地には、10% FCS、2.1 mM L-glutamine、100 IU/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin（Invitrogen）を含む RPMI 1640（Invitrogen）（complete medium）を使用し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで維持培養した。200 μ l の complete medium に懸濁した J774. 1 細胞（ 4.0×10^5 cells）を 96 穴細胞培養用マイクロプレート（BD）に播種し、2 時間 37°C、5 % CO₂ インキュベーターで維持した。complete medium で 2 回洗浄した後、ODN を終濃度 10 μ M となるように加え、37°C、5% CO₂ インキュベーターで維持した。24 時間後、培養上清を回収し、-20°C で保管した。

1-5-14) ELISA

培養上清中の IL-12 は、DuoSet ELISA Development Systems（R&D Systems, USA）を使用して測定した。測定に当たっては、同 kit のプロトコルに厳密に従って実施した。また、ELISA プレーートの洗浄には、ELISA プレート用ウォッシャー（Model 1575, Bio-Rad）を使用し、吸光度は Multiskan Spectrum 1500（Thermo Electron）を使用し測定した。

1- 5-15) ODN BL07 が刺激するリンパ球サブセットの検討

マウス脾臓 B および T リンパ球の精製は磁気ビーズ分離法、すなわち MACS システム（Miltenyi Biotec, Germany）を使用して実施した。2-6 の方法に準じて調製したマウス脾臓細胞を細胞分離用 buffer（0.5% BSA（Sigma）および 2

mM EDTA を含む PBS) に懸濁し、ビオチン標識抗マウス CD45R 抗体 (Miltenyi Biotec) で 4°C、20 分間反応させ、洗浄後、ストレプトアビジン標識マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を 4°C、15 分間反応させた。その後、MACS カラム (Miltenyi Biotec) に供した。吸着画分を B リンパ球画分、非吸着画分を T リンパ球画分とし、それぞれ 2×10^5 cells /well になるように 2 %FCS を含む RPMI1640 中に懸濁し、2-7 の方法と同様にリンパ球幼若化試験に供した。

1- 5-16) マウス TLR9 導入細胞による ODN BL07 のレポーターアッセイ試験

ヒト 293T 細胞は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター (Japan) より分譲された。培地には、complete DMEM (10% FCS, 50 mg/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.11 mg/ml sodium pyruvate および 0.5 mM 2-メルカプトエタノールを含む Dulbecco' s modified Eagle medium) を使用し、37°C、5% CO₂ インキュベーターで維持培養した。

293T 細胞を ϕ 60 mm の Dish に 1×10^6 個ずつ播種し、37°C 24 時間、5% CO₂ インキュベーターで培養した。その後、リポフェクタミン (Invitrogen) 10 μ l を OPTI-MEM 培地 (Invitrogen) 200 μ l に混合した溶液と pcDNA3+mouseTLR9 vector 2.5 μ g および NF-kappaB luciferase ベクター 2.5 μ g を溶解した OPTI-MEM 培地 200 μ l を混合した。培地を 1.6 ml 加えて total 2 ml とした後、細胞の入った Dish に加え、4 時間 37°C 5 % CO₂ インキュベーターで維持した。その後、20% FCS を含む D-MEM 培地を 2 ml 添加し (FCS 終濃度 10%)、一晚培養した。リポフェクタミン添加 24 時間後に PBS で 3 回洗浄し、培地を 10% FCS を含む D-MEM 5 ml に置換した。さらにその 24 時間後、24 穴マイクロプレートに 4×10^4 個ずつ 2% FCS を含む D-MEM 1ml に置換して播種し、37°C 5 % CO₂ 条件下で一晚インキュベートした。

その後、ODN (10 μ M) を添加、24 時間刺激後 1 \times Cell Lysis buffer (Promega, USA) で室温、10 分間処理し、細胞溶解液を回収した。同溶解液を遠心分離 (17,000 g, 5 分, 4°C) 後、上清を回収した。この上清にルシフェリンを添加し、添加直後から 2~10sec までの発光変化をプレートルミノメーター (MicroLumat Plus LB96V, Berthold Technologies, Germany) を用いて測定し、その際の発光強度を NF- κ B 活性とし、次式を用いて SI 値として評価した。

$$SI = \frac{[(\text{resonance unit (RU)})_{\text{in stimulated culture}} - (\text{RU})_{\text{background}}]}{[(\text{RU})_{\text{in non-stimulation}} - (\text{RU})_{\text{background}}]}$$

1- 5-17) 統計処理

本章で得られた実験結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) として示した。また、統計学的分析には Microsoft Excel 2000 (Microsoft, USA) を使用し、対応の無い Student の t 検定により実施し、 p 値が 0.05 未満である場合、有意差があると判定した。

1-6) ODN BL07 の *in vitro* における抗アレルギー作用の検討

1-6-1) 実験動物

Specific pathogen free (SPF) BALB/c マウスは日本チャールズリバー (Japan) より 6 週齢の雄を購入し、CRF-1 飼料 (オリエンタル酵母工業, Japan) および水道水を自由摂取させ、SPF 環境下での予備飼育を行った。実験開始時には 7 週齢の個体を用いた。

1-6-2) ODNs

ODN は全て SigmaGenosys (Japan) に化学合成を依頼した。本節の実験で使用

した ODN は ODN BL07 (5' -GCGTCGGTTTCGTTGCTCAC-3') および BL07 のフォス
フォロチオエート修飾体 ODN BL07S (同配列) である。化学合成された ODN の
エンドトキシン濃度は、トキシカラーシステム (生化学工業) を用い測定し、
その濃度が 10 ng/mg ODN 未満であることを確認した。

1-6-3) 卵白アルブミン (OVA) による BALB/c マウスの感作

10 mg/ml OVA (grade V, Sigma) 溶液を注射用生理食塩水 (大塚製薬) を用
いて調製した。調製後、OVA 溶液は 0.22 μ m の滅菌フィルター (MILLEX-GV,
ミリポア, Japan) を用いてフィルター濾過した。この溶液と等量の水酸化アル
ミニウムゲルを混合し、総量で 200 μ l (OVA 1 mg/mouse, 水酸化アルミニウ
ムゲル 2 mg/mouse) を、7 週齢の雄 BALB/c マウスに腹腔内投与した。

1-6-4) OVA 感作マウス脾臓細胞からの IgE および cytokine 誘導試験

2-1-3 で OVA 感作させた BALB/c マウスから、腹腔内投与の 10 日後に脾臓細
胞を調製した。調製した脾臓細胞を complete medium (12.5% FCS) に懸濁し、
 2.5×10^6 cell/ml に濃度を調整した後、48 穴マイクロプレート (BD) に 400 μ l
播種した。播種後、直ちに RPMI1640 培地に溶解させフィルター濾過した 1
mg/ml OVA を 50 μ l (終濃度 100 μ g/ml) 、ODN サンプル (ODN BL07 および ODN
BL07S) を 50 μ l (終濃度 0.1~10 μ M) を添加・攪拌後、37°C、5 % CO₂ イン
キュベーターで培養した。7 日後、培養液を回収、遠心分離 (500 g, 5 分,
4°C) 後の上清を -20°C で保存した。

1-6-5) Ig アイソタイプスイッチアッセイ

2-1-3 で OVA 感作させた BALB/c マウスから、脾臓細胞を調製後、精製 B リンパ球を調製した。本実験では、1 度目で得られた B リンパ球をさらにもう一度同様の精製工程を繰り返すことで、より純度の高い B リンパ球を得た。精製 B リンパ球を complete medium に懸濁し、 2.0×10^6 cell/ml に濃度を調整した後、10 ng/ml マウスリコンビナント IL-4 (R&D Systems) および 3 μ g/ml 抗マウス CD40 抗体 (R&D Systems) 存在下で、37°C、5 % CO₂ インキュベーターで培養することにより、IgE を産生させた。ODN サンプルは培養開始直前に各濃度で添加し、10 日後に培養上清を 2-1-4 の方法と同様に回収し、-20°C で保存した。

1-6-6) ELISA

本実験では、培養上清中の total IgE、IgG1 および IgG2a は Bethyl laboratory Inc (USA) 製、cytokine (IL-4, IL-12 および IFN- γ) については DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) を使用して測定した。測定に当たっては、各 kit のプロトコルに厳密に従って実施した。また、ELISA プレートの洗浄には、ELISA プレート用ウォッシャー (Bio-Rad) を使用し、吸光度は Multiskan Spectrum 1500 (Thermo Electron) を使用し測定した。

1-6-7) 統計処理

本章で得られた実験結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) として示した。また、統計学的分析には Microsoft Excel 2000 (Microsoft, USA) を使用し、対応の無い Student の t 検定により実施し、 p 値が 0.05 未満である場合、有意差があると判定した。

1-7) 皮下投与における ODN BL07 の抗アレルギー作用の検討

1-7-1) 実験動物

Specific pathogen free (SPF) BALB/c マウスは日本チャールズリバーより 6 週齢の雌を購入し、CRF-1 飼料および水道水を自由摂取させ、SPF 環境下での馴化飼育を行った。実験開始時には 7 週齢の個体を用いた。

1-7-2) ODNs

ODN は全て SigmaGenosys に化学合成を依頼した。本節の実験では、免疫刺激性配列として ODN BL07S (5' -GCGTCGGTTTCGTTGCTCAC-3'、BL07 のフォスフォロチオエート修飾体) およびネガティブコントロールとして、第 3 章の検討においてリンパ幼若化活性も IL-12 誘導も確認されなかった

ODN BL06S (5' -CGTTAGTGGGTTTCGCCCAT-3') を用いた。化学合成された ODN のエンドトキシン濃度は、トキシカラーシステム(生化学工業)を用い測定し、その濃度が 10 ng/mg ODN 未満であることを確認した。

1-7-3) 実験プロトコル

PBS と Inject Alum (Pierce, USA) を等量混合した溶液を作成した。この溶液を用いて、対照群としては OVA 20 μ g/100 μ l、ODN 群として OVA 20 μ g および ODN (0.1~10 μ g) /100 μ l となるように調製し、7 週齢の BALB/c マウスに 100 μ l 皮下投与した。1 回目の投与日を D0 とし、D14 にも同条件での皮下投与を行った。

2 回目の皮下投与 7 日後、すなわち D21 に尾部より採血し、遠心分離後(2000 g, 15 分, 室温) 血清のみを回収し、血清は-20°C で保存した。Time course study においては、D21 に加えて、D14 および D28 でも採血を実施した。

1-7-4) マウス脾臓細胞からの cytokine 誘導試験

マウス脾臓細胞の調製は、第3章材料と方法2-6に準じて行った。調製した細胞を complete medium (10% FCS) に懸濁し、 5.0×10^6 cell/ml に濃度を調整した後、48 穴マイクロプレート (BD) に 400 μ l 播種した。播種後、直ちに RPMI1640 培地に溶解させフィルター濾過した 1 mg/ml OVA を 100 μ l (終濃度 100 μ g/ml) を添加・攪拌後、37°C、5 % CO₂ インキュベーターで培養した。3 日後、培養液を回収し、遠心分離 (500 g, 5 分, 4°C) 後の上清を回収し、-20°C で保存した。

TGF- β の誘導に関しては、Nakao ら [32] の方法を参考にした。すなわち、調製した細胞を 100 IU/ml penicillin および 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen) を含む AIM-V 培地 (FCS 非含有) (Invitrogen) に懸濁し、 5.0×10^6 cell/ml に濃度を調整した後、48 穴マイクロプレート (BD) において OVA 100 μ g/ml 存在下または非存在下で、37°C において 5 % CO₂ インキュベーターで 4 日間培養した。培養液を回収し、遠心分離 (500 g, 5 分, 4°C) 後の上清を回収した。上清 500 μ l に対し 1 M HCl 100 μ l を添加し、室温で 10 分間保持後、1.2 M NaOH を含む 0.5 M HEPES buffer (Invitrogen) にて中和し、-20°C で保存した。

1-7-5) フローサイトメトリー解析

D21 で得られた脾臓細胞中の CD4⁺CD25⁺ T 細胞の発現を検討するため、FACSCalibur™ flow cytometer を用いた解析を実施した。すなわち、調製した脾臓細胞を適当量の anti-mouse PECy5-CD3、anti-mouse PE-CD4 および anti-mouse FITC-CD25 モノクローナル抗体 (eBioscience) を使用して、4°C で 30 分間維持して染色した。その後、2% FCS を含む PBS にて遠心洗浄後、再度同緩衝液に懸濁させ分析に供した。総細胞数で 100,000 個取り込み、解析は Cell

Quest software (BD) を用いて実施し、各個体毎での CD4⁺CD25⁺T 細胞の比率を算出した。

1-7-6) ELISA

本実験では、培養上清中の Total IgE、IgG1 および IgG2a は Bethyl laboratory Inc 製、cytokine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ および TGF- β) については DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) を使用して測定した。測定に当たっては、各 kit のプロトコルに厳密に従って実施した。また、ELISA プレートの洗浄には、ELISA プレート用ウォッシャー (Bio-Rad) を使用し、吸光度は Multiskan Spectrum 1500 (Thermo Electron) を使用し測定した。

OVA 特異的 Ig の測定は、Sato ら [33] の方法に準じて行った。標準血清は OVA 20 μ g/alum 4mg を 2 週間ごとに 3 回皮下投与した BALB/c マウスの最終免疫から 1 週間後の血清を用いた。結果は、標準血清を用いた ELISA 反応での値を 1000 U/ml とした相対値で示した。

1-7-7) 統計処理

本章で得られた実験結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) として示した。また、統計学的分析には SPSS statistical version 11.0 (SPSS) を使用し、群間比較は Mann-Whitney *U*-test により実施し、*p* 値が 0.05 未満である場合、有意差があると判定した。

1-8) 経口投与における ODN BL07 の抗アレルギー作用の検討

1-8-1) 実験動物

Specific pathogen free (SPF) BALB/c マウスは日本チャールズリバーより 7

週齢の雌を購入し、CRF-1 飼料および水道水を自由摂取させ、SPF 環境下にて馴化飼育を行った。実験開始時には 8 週齢の個体を用いた。

1-8-2) ODNs

ODN は全て SigmaGenosys に化学合成を依頼した。本節の実験では、免疫刺激性配列として第 3 章で同定した ODN BL07S (5' -GCGTCGGTTTCGTTGCTCAC-3'、BL07 のフォスフォロチオエート修飾体)を用いた。化学合成された ODN のエンドトキシン濃度は、トキシカラーシステムを用い測定し、その濃度が 10 ng/mg ODN 未満であることを確認した。

1-8-3) 実験プロトコル

実験群は 3 群設定した。ODN 群には D0~2 および D7~9 の計 6 回、5mg/ml PBS の ODN BL07S 溶液を 200 μ l、すなわち 1 回当たり 1 mg/mouse となるようゾンデ投与した。コントロール群および naïve 群 (実験コントロール) では 200 μ l の PBS を同様に投与した。

抗原感作には 2-1 および 2-2 と同様、OVA を使用した。すなわち、200 μ g/ml OVA (Sigma) 溶液を注射用生理食塩水 (大塚製薬) を用いて調製した。調製後、OVA 溶液は 0.22 μ m の滅菌フィルター (ミリポア) を用いてフィルター濾過した。この溶液と等量の水酸化アルミニウムゲルを混合し、混合溶液を 100 μ l (OVA 10 μ g/mouse, 水酸化アルミニウムゲル 1 mg/mouse) を、D2 および D12 の計 2 回、ODN 群およびコントロール群のマウスに腹腔内投与した。naïve 群のマウスには、水酸化アルミニウムゲルのみを腹腔内投与した。

D20 においてエーテル麻酔下にて、腹部下行静脈から採血することにより屠殺し、直ちに脾臓を摘出し、脾臓細胞の調製を行った。血液は遠心分離 (2,000 g, 15 分, 室温) にて血清を分離し、-20°C にて保存した。

1-8-4) 脾臓細胞からの cytokine 誘導試験

脾臓細胞の調製は、第3章材料と方法 2-6 に準じて行った。また、その後の cytokine 誘導試験は、全て 2-2-4 の方法に準じて実施した。得られた培養上清液は cytokine 測定までの間、 -20°C にて保存した。

1-8-5) ELISA

本実験では、培養上清中の Total IgE、IgG1 および IgG2a は Bethyl laboratory Inc 製、cytokine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ および TGF- β) については DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) を使用し、本章 2-2-6 に準じて測定を実施した。

OVA 特異的 Ig の測定は、Sato ら [33] の方法に準じて行った。OVA 特異的 Ig の測定で用いた標準血清には、OVA 10 $\mu\text{g}/\text{alum}$ 1mg を 10 日ごとに 3 回腹腔内投与した BALB/c マウスの最終免疫から 10 日後の血清を用いた。結果は、標準血清を用いた ELISA 反応での値を 100 U/ml とした相対値で示した。

1-8-6) 統計処理

本章で得られた実験結果は、平均値 \pm 標準偏差 (SD) として示した。また、統計学的分析には SPSS statistical version 11.0 (SPSS) を使用し、群間比較を対応の無い Student の t 検定により実施し、 p 値が 0.05 未満である場合、有意差があると判定した。

2. 結果

2-1) BB536 ゲノム DNA の免疫刺激性

BB536 ゲノム DNA より免疫刺激性配列の同定作業に入る前に、その免疫刺激性についての検討を実施した。その指標には、様々な物質の免疫賦活化能の検討に汎用されるリンパ球幼若化活性を用いた。その結果、BB536 ゲノム DNA は、SI 値 4.0~15.0 の間で、濃度依存的 ($1\sim 50\ \mu\text{g/ml}$) に有意なリンパ球幼若化活性を示した (Fig. 2-1)。また、BB536 ゲノム DNA を制限酵素 *Sau3AI* で処理した消化断片も有意な活性値 (SI=14.8) を示し、その値は同濃度 ($10\ \mu\text{g/ml}$) におけるゲノム DNA の活性値 (SI=5.4) の約 2.7 倍であった。本実験においてポジティブコントロールとして用いた LPS ($20\ \mu\text{g/ml}$) および Concanavalin A ($2\ \mu\text{g/ml}$) の SI 値はそれぞれ 45 および 80 であった。

以上の結果から、BB536 ゲノム DNA の免疫刺激性が確認され、以後の実験で、BB536 ゲノム DNA からの免疫刺激性配列の同定を試みた。

2- 2) BB536 ゲノム DNA からの免疫刺激性配列の同定

BB536 ゲノム DNA の *Sau3AI* 消化物の 500bp 以下断片 (Fig. 2-2A) を、pUC119 に組み込むクローニングを実施した。カラーセクション法により、消化断片が組み込まれたと推測される白色コロニーをピックアップし、合計で 62 コロニーからプラスミドを抽出した。これらプラスミドを用いて挿入部位前後にある M13 プライマー系を利用した PCR 反応を実施後、アガロース電気泳動によりその PCR 産物の分子量を推定した結果、48 クローンを消化断片が実際に組み込まれたプラスミドであると確認した (Fig. 2-2B)。

次いで、この 48 クローンの塩基配列を決定し、決定した塩基配列情報から各 PCR 産物の分子量を計算し、48 クローンの PCR 産物のリンパ球幼若化活性を終濃度 $50\ \text{pmol/ml}$ にて測定した。その結果、全てのクローンにおいてコントロ

ールよりも有意に高いリンパ球幼若化活性が確認された (Fig. 2-3)。この結果中で SI 値 7 以上を示す高い活性を持つ 14 クローンに着目し、塩基配列上の相同性解析を実施した。Bifidobacteria のゲノム DNA は GC 含量が高いため、数多くの CpG-like motif を有していることが確認された。相同性解析の結果から、20 mer の ODN を 20 個選抜して化学合成を行った (Fig. 2-4)。

20 配列から免疫刺激性配列を同定するに当たっては、獲得免疫系刺激の指標として、これまで使用して来た BALB/c マウス脾臓細胞に対するリンパ球幼若化活性を測定した。その結果、合成 20 ODN の中では ODN BL07 (5' -GCGTCGGTTTCGTTGCTCAC-3') のみが有意なリンパ球幼弱化活性 (Fig. 2-5A, SI=5.0, $p<0.01$) を示した。なお、この実験における ODN のポジティブおよびネガティブコントロールとしては用いた CpG1826 および CpG1826Me の SI 値は、それぞれ 15.0 および 1.1 であった。また、自然免疫系刺激の指標として、マウスマクロファージ様細胞である J774.1 を ODN で刺激し、Th1-type cytokine である IL-12 誘導値を測定した。その結果、20 ODN 中では ODN BL07、BL15 および BL18 が高い IL-12 誘導値 (Fig. 2-5B) を示した。

以上の結果から、ODN BL07 を BB536 ゲノム DNA から免疫刺激性配列として同定した。

2- 3) ODN BL07 の特性解析

免疫刺激性配列として同定された ODN BL07 が示すリンパ球幼若化活性が、どのリンパ球集団を刺激して示されているかの検討を実施した。MACS 法によって分離された B および T リンパ球を ODN BL07 で刺激した結果、ODN BL07 は B リンパ球で有意な幼若化活性を示し (SI=2.7, $p<0.05$)、T リンパ球では示さなかった (Fig. 2-6A)。

また、ODN BL07 が免疫刺激性配列のレセプターである TLR9 によって認識さ

れるかを検討するため、ヒト 293T 細胞に mouse TLR9 を強制発現させた細胞での NF- κ B 測定を実施した。刺激後、ODN BL07 はコントロールと比較して有意に高い活性値 (Fig. 2-6B, SI=2.3, $p<0.01$) を示した。

以上の結果から、ODN BL07 は B セルマイトジェンであり、その生理活性は TLR9 によって認識されることにより引き起こされていることが示唆された。

2-4) *in vitro*における ODN BL07 の抗アレルギー作用の検討

ODN BL07 の抗アレルギー作用を検討するため、OVA で感作させることにより Th2 偏向となった BALB/c マウスの脾臓細胞を用いて、その IgE 産生量を評価した。その結果、ODN BL07 および BL07S とともに濃度依存的に total IgE の産生を有意に抑制した (Fig. 2-7)。IgE 産生の抑制機構を検討するため、Th1 cytokine として IFN- γ および IL-12 を、Th2 cytokine として IL-4 を ELISA により測定した。その結果、ODN BL07 でも BL07S でもコントロールと比較して有意な IFN- γ および IL-12 の産生が認められた (Fig. 2-8)。一方で、IL-4 に関してはコントロールとの差はいずれの濃度においても認められなかった (Fig. 2-9)。

精製 B 細胞 (> 98%) を recombinant mouse IL-4 および anti-CD40 抗体存在下で強制的に B 細胞単独から IgE を産生させる系を用いて、ODN BL07 の Ig クラススイッチに与える影響を検討した。ODN BL07 (10 μ M) および BL07S (10 μ M) とともにコントロールと比較して有意に低い total IgE 値を示した (Table 2-1)。またコントロールでは検出限界以下であった total IgG2a は、ODN BL07 (10 μ M) および BL07S (10 μ M) とともに顕著に増加・産生された。Total IgG1 に関してはコントロールとの有意差は認められなかった (Table 2-1)。なお、本実験系において IFN- γ はコントロールでも ODN 処理でも検出限界以下であった。

2-5) 皮下投与における ODN BL07 の抗アレルギー作用の検討

2-5-1) ODNs の *in vivo* における IgE 産生への効果

ODN BL07S および BL06S の皮下投与 (10 μ g/mouse) における OVA 感作 BALB/c マウスでの IgE 産生量への影響を検討した。D21 での血清中の OVA 特異的および total IgE とともに ODN 群でコントロール群と比較して有意に低い値を示した (Fig. 2-10)。一方で ODN のネガティブコントロールとして用いた BL06S 投与群における血清中の OVA 特異的および total IgE は、Control 群と比較して差は認められなかった (Fig. 2-10)。

Naïve 群での OVA 特異的 IgE 値は検出限界以下であり、また total IgE は 142.4 ± 49.1 pg/ml ($p < 0.01$ compared to control group) であった。

2-5-2) Ig および各種 cytokine に対する ODN BL07S 投与の Time course study

ODN BL07S 投与 (10 μ g/mouse) による血清 IgE への効果を D14 から D28 まです経時的に観察した。OVA 特異的および total IgE とともに 2 回目の OVA 感作前である D14 の時点で、コントロール群と比較して有意に低い値を示し、これは D28 まで維持されていた (Fig. 2-11)。OVA 特異的 IgG2a 値は、ODN 群で D21 および D28 でコントロール群よりも有意に高い値を示したが、一方で total IgG2a 値では群間での差は認められなかった (Fig. 2-12)。コントロール群と比較して、D21 において OVA 特異的および total IgG1 値は ODN 群で有意に低い値を示したが、D14 および D28 では群間での統計学的な差は無かった (Fig. 2-12)。

ODN BL07S による IgE 産生抑制作用におけるそのメカニズムを明らかにするため、OVA での再刺激による培養条件により、脾臓細胞からの cytokine 産生を検討した。IL-12 産生量は、D14~28 において ODN 群ではコントロール群よりも

有意に高い値を示した (Fig. 2-13)。IFN- γ は D21 および D28 で、ODN 群はコントロール群よりも高い傾向を示したが、有意では無かった。一方で、IL-4 および IL-5 の ODN 群での値は、D14~28 においてコントロール群よりも有意に低い値を示した。IL-13 の産生も D14 および D28 においてコントロール群よりも有意に低い値を示した (Fig. 2-14)。

OVA 非存在下での IL-12 産生量は、naïve、コントロール、ODN 群でそれぞれ、 76.4 ± 6.2 pg/ml, 70.2 ± 17.6 pg/ml, 80.8 ± 12.6 pg/ml であり、群間での有意差は認められなかった。IL-4、IL-5、IL-13 および IFN- γ の OVA 非存在下での産生量は全て検出限界以下であった。

2-5-3) ODN BL07S の IgE および cytokine 産生に対する用量依存性の検討

IgE および cytokine 産生に対する用量依存性を検討するため、1 回当たりの ODN BL07S の皮下投与量を 0.1、1.0 および $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の 3 濃度について実験を行った。OVA 特異的および total IgE 産生の抑制については、ODN BL07S の投与に関して用量依存性が認められた (Fig. 2-15)。1.0 および $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量では、コントロール群に比較して有意に低い値を示し、0.1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量では低い傾向が認められた (Fig. 2-15)。OVA 特異的 IgG2a、OVA 特異的 IgG1、total IgG1 については $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量で群間での有意差が認められた (Fig. 2-16)。

脾臓細胞からの cytokine 誘導では、IL-4、IL-5、IL-12 および IL-13 の誘導値で $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量において群間での有意差が認められたが、0.1、1.0 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量において群間での有意差および傾向は認められなかった (Fig. 2-17, 2-18)。

2-5-4) 制御性 T 細胞に関する検討

Th2 反応抑制への制御性 T 細胞の関与を検討するため、制御性 T 細胞に關与する因子について検討した。脾臓細胞からの cytokine 誘導では、IL-10 は 10 μ g/mouse の投与量において、ODN 群でコントロール群よりも有意に低い値を示した (Fig. 2-19)。TGF- β の産生に関しては、ODN 群と Control 群でほぼ同じ値を示した (Fig. 2-19)。制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺T 細胞に關して、全脾臓細胞における同細胞群の占める割合は、ODN 群と Control 群でほぼ同じ値を示した。(Table 2-2)

2-6) 経口投与における ODN BL07 の抗アレルギー作用の検討

OVA 感作 BALB/c マウスでの ODN BL07S の経口投与による IgE 産生量への影響を検討した。D20 での血清中の OVA 特異的 IgE は、ODN 群でコントロール群と比較して有意に低い値を示した。また、total IgE 値は ODN 群でコントロール群と比較して低い傾向であった (Fig. 2-20)。

OVA 特異的および total IgG2a 値は、D20 において ODN 群でコントロール群よりも有意に高い値を示した (Table 2-3)。OVA 特異的および total IgG1 は、D20 において群間での差は認められなかったが、D17 において OVA 特異的 IgG1 がコントロール群と比較して、有意に低い値 (Control 群: 22.2 ± 5.7 U/ml, ODN 群: 11.7 ± 7.9 U/ml, $p < 0.05$) を示した。

ODN BL07S の経口投与による Th1/Th2 バランスへの影響を評価するため、OVA 特異的 IgG2a/OVA 特異的 IgG1 (Th1 associated/Th2 associated) スコアを各個体で算出し、Th1/Th2 バランススコアとして評価した。その結果、ODN 群はコントロール群よりも有意に高いスコアを示した (Table 2-3)。

ODN BL07S による IgE 産生抑制作用におけるそのメカニズムを明らかにするため、OVA での再刺激による培養条件により、脾臓細胞からの cytokine 産生を検討した。IFN- γ においては、ODN 群ではコントロール群よりも有意に高い値

を示した (Fig. 2-21)。IL-12 産生量は、ODN 群ではコントロール群よりも高い傾向を示したが、統計学的な有意差は無かった。一方で、IL-4 および IL-5 の ODN 群での値は、コントロール群よりも低い傾向を示したが、有意差は認められなかった (Fig. 2-22)。制御性 cytokine である IL-10 および TGF- β は群間での有意差は認められなかった (Fig. 2-23)。

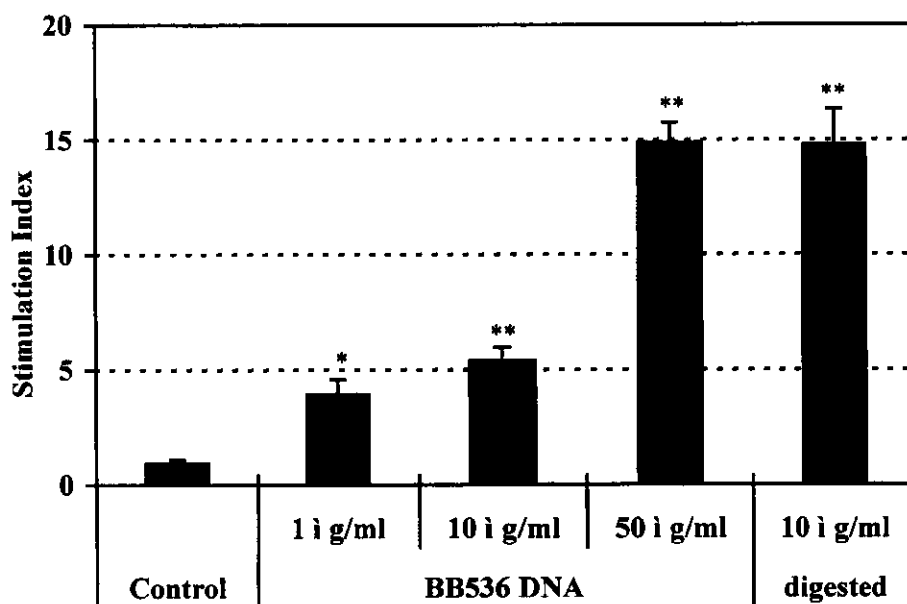


Fig. 2-1. Mitogenic activity of genomic DNA and digests from *Bifidobacterium longum* BB536.

Splenic cells from BALB/c mice were cultured in 96-well microplates at a concentration of 2.0×10^5 cells in the presence of DNA or *Sau* 3AI-digested DNA for 32 h at 37 °C. After pulse labeling with ^3H -thymidine for 16 h, the amount of ^3H -thymidine incorporated into splenic cells were determined. Data represent mean \pm SD stimulation index of triplicate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

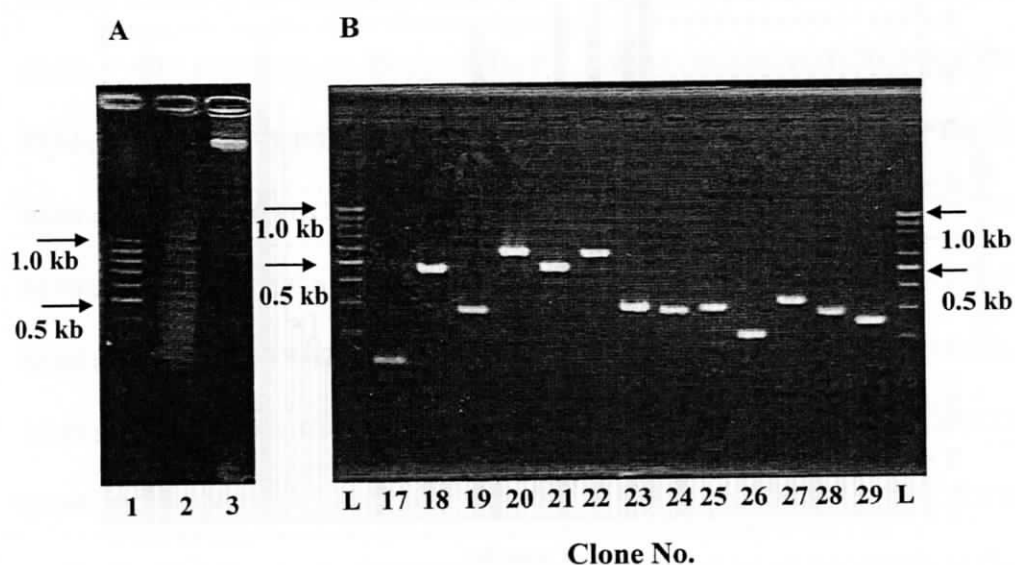


Fig. 2-2. Agarose electrophoresis of digested DNA fragments.

(A) Genomic DNA from *Bifidobacterium longum* BB536 was digested with *Sau* 3AI. Lane 1; genomic DNA, Lane 2; 1.0 kb ladder, Lane 3; digested DNA.

(B) Agarose electrophoresis of PCR products. Lane L; 1.0 kb ladder, Others; PCR products amplified with the M13 primers for multi-cloning site of pUC119 vector.

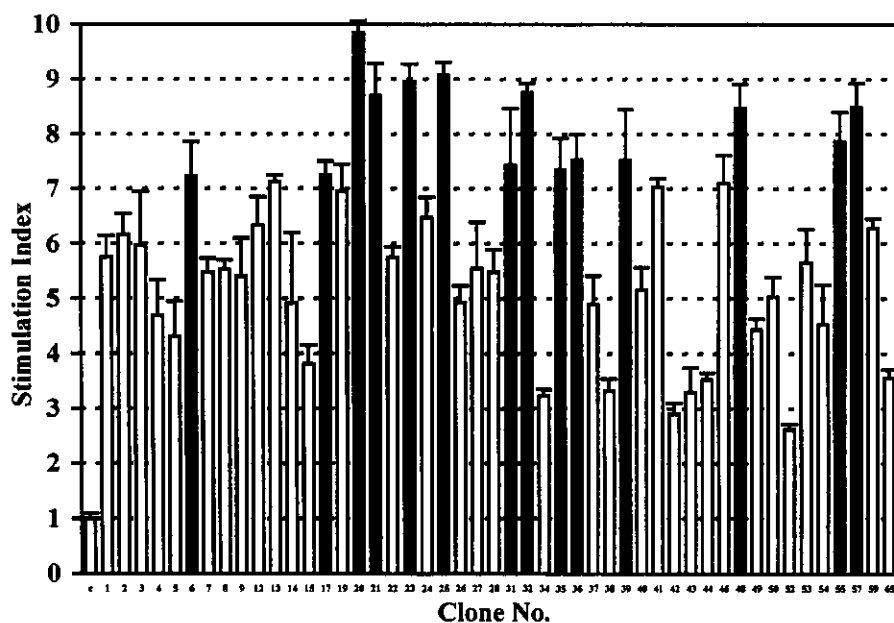


Fig. 2-3. Mitogenic activity of genomic DNA clones.

DNA clones were amplified by PCR and amplified DNA fragments were extracted. DNA was tested for mitogenic activity in splenic cells from BALB/c mice. Data represent mean stimulation index of triplicate cultures compared to controls stimulated using amplified DNA from pUC119 without inserted DNA. For the 14 mitogenic DNA clones (closed bar), nucleotide sequences displaying high homology were analyzed.

BL01 ; 5'-CATACTTTTCGGATTTCAGTG-3'	BL11 ; 5'-CTTTGAACTGATTGAGTTCC-3'
BL02 ; 5'-GTATTTCTCGAGTTTCACCA-3'	BL12 ; 5'-AAGTGTGTGTTCCCTGTGGG-3'
BL03 ; 5'-CACGGATTTGATGATGCGTT-3'	BL13 ; 5'-GCCCCGAATTTCTTGGTGGGG-3'
BL04 ; 5'-ATGAACGTGCAGACCGTTAT-3'	BL14 ; 5'-GATCAATTTGCGCCATGCCT-3'
BL05 ; 5'-GCTATTCGGATAATTACGAT-3'	BL15 ; 5'-TGGCGGTCAGTTCCGTTTGC-3'
BL06 ; 5'-CGTTAGTGGGTTTCGCCCCAT-3'	BL16 ; 5'-CCTTTGCCTGCGTGCCTTTG-3'
BL07 ; 5'-GCGTCGGTTTCGGTGCTCAC-3'	BL17 ; 5'-TCTATGCCTTTACCCGTGAG-3'
BL08 ; 5'-TGTCGTAGTTTTCCAGCATG-3'	BL18 ; 5'-GGACGATTTGCTGCGTCGCT-3'
BL09 ; 5'-ATTCCTGAGTCTTTTTTGAA-3'	BL19 ; 5'-TTACGGTTTTGAAGAATCTG -3'
BL10 ; 5'-TTATTACTGGATTTCGATGAA-3'	BL20 ; 5'-CCAGCCGGAGATTTTCGAGC-3'

Fig. 2-4. Sequences of synthesized ODN sequences from mitogenic DNA clones.

Mitogenic DNA was sequenced using a DNA sequencer, and homologies among nucleotide sequences were analyzed. A total of 20 oligodeoxynucleotides (20 mers) displaying high homology were obtained and designated BL01 to BL20.

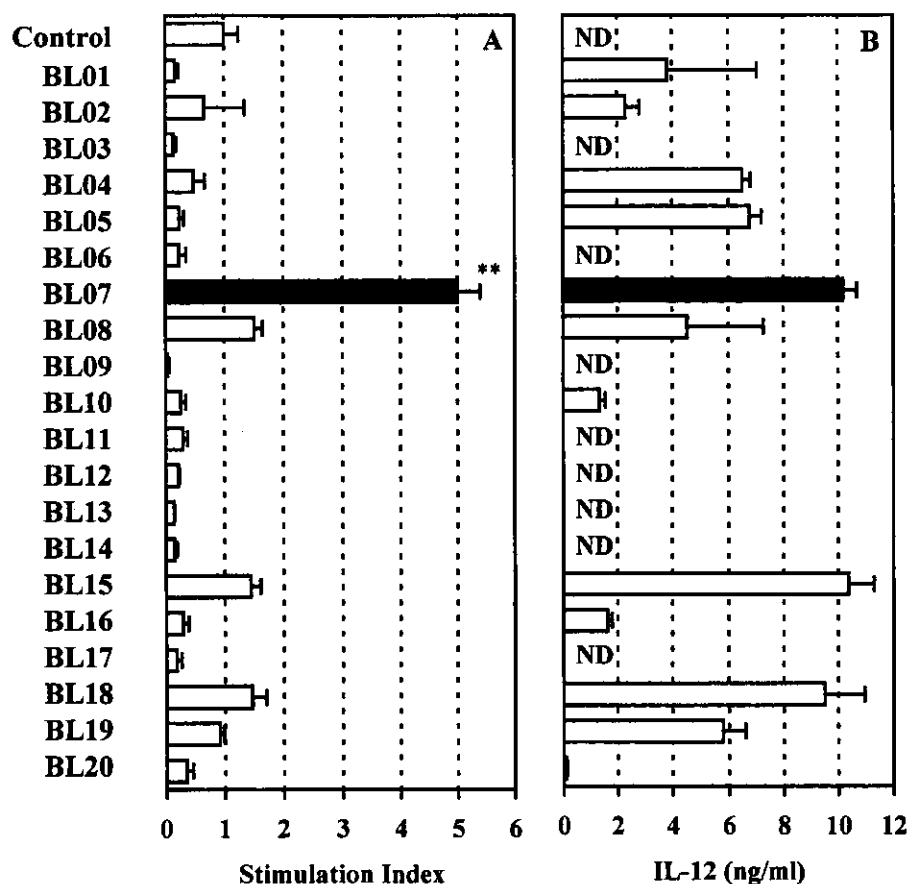


Fig. 2-5. Identification of an immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide from genomic DNA of *Bifidobacterium longum* BB536.

(A) Mitogenic activity of homologous ODN at concentrations of 10 μ M. Data shown represent mean \pm SD of 3 independent experiments. ** $p < 0.01$ compared to control.

(B) IL-12 levels in supernatants were determined using an ELISA kit. J774.1 cells were stimulated with the selected 20 ODNs (10 μ M) for 16 h. Data shown represent mean \pm SD of 3 independent experiments. ND, not detected.

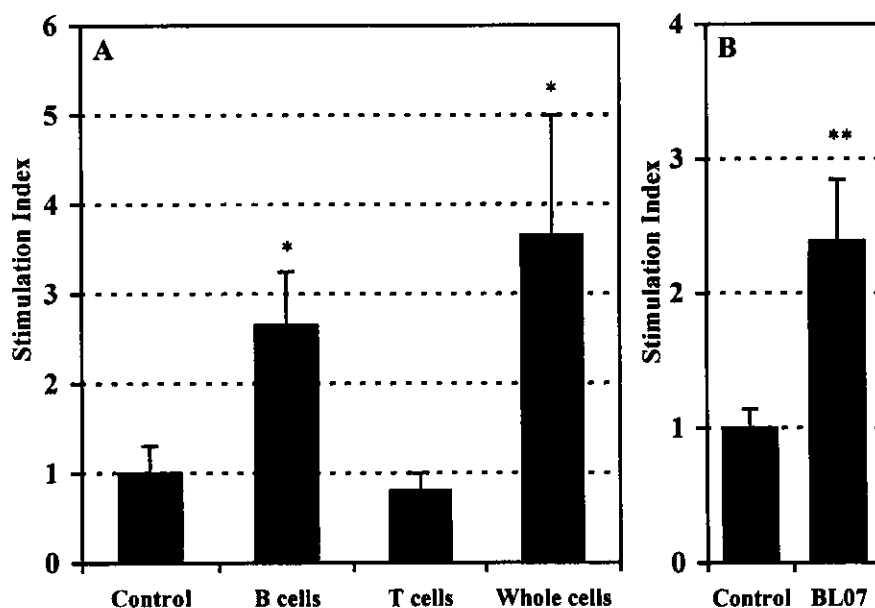


Fig. 2-6.

(A) Mitogenic activity in murine B and T lymphocytes by synthesized ODN BL07.

Splenic whole, B and T lymphocytes from BALB/c mice were cultured in 96-well microplates in the presence of ODN BL07 (10 μ M). Data shown represent mean \pm SD of 3 independent experiments. * p < 0.05 compared to control.

(B) Luciferase activities of mouse TLR9-transfected cells at 24 h after treatment with ODN BL07 (10 μ M).

Data shown represent mean \pm SD of 3 independent experiments. ** p < 0.01 compared to control.

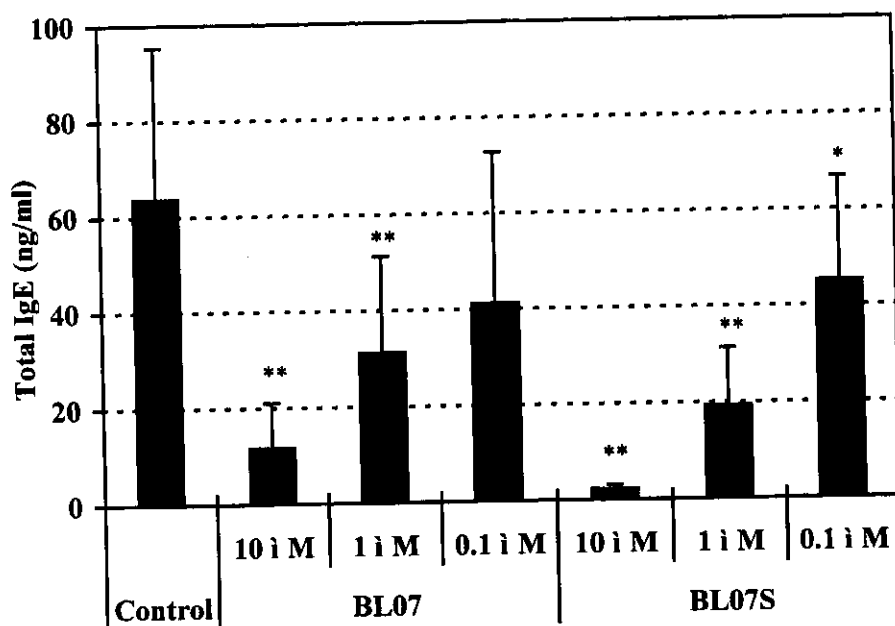


Fig. 2-7. ODN BL07 inhibits IgE production from splenic cells of OVA-sensitized BALB/c mice.

Splenic cells of BALB/c mice sensitized with OVA were cultured at 2.5×10^6 cells/ml using 100 μ g/ml OVA in the presence of ODNs for 7 days. Data are shown as mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

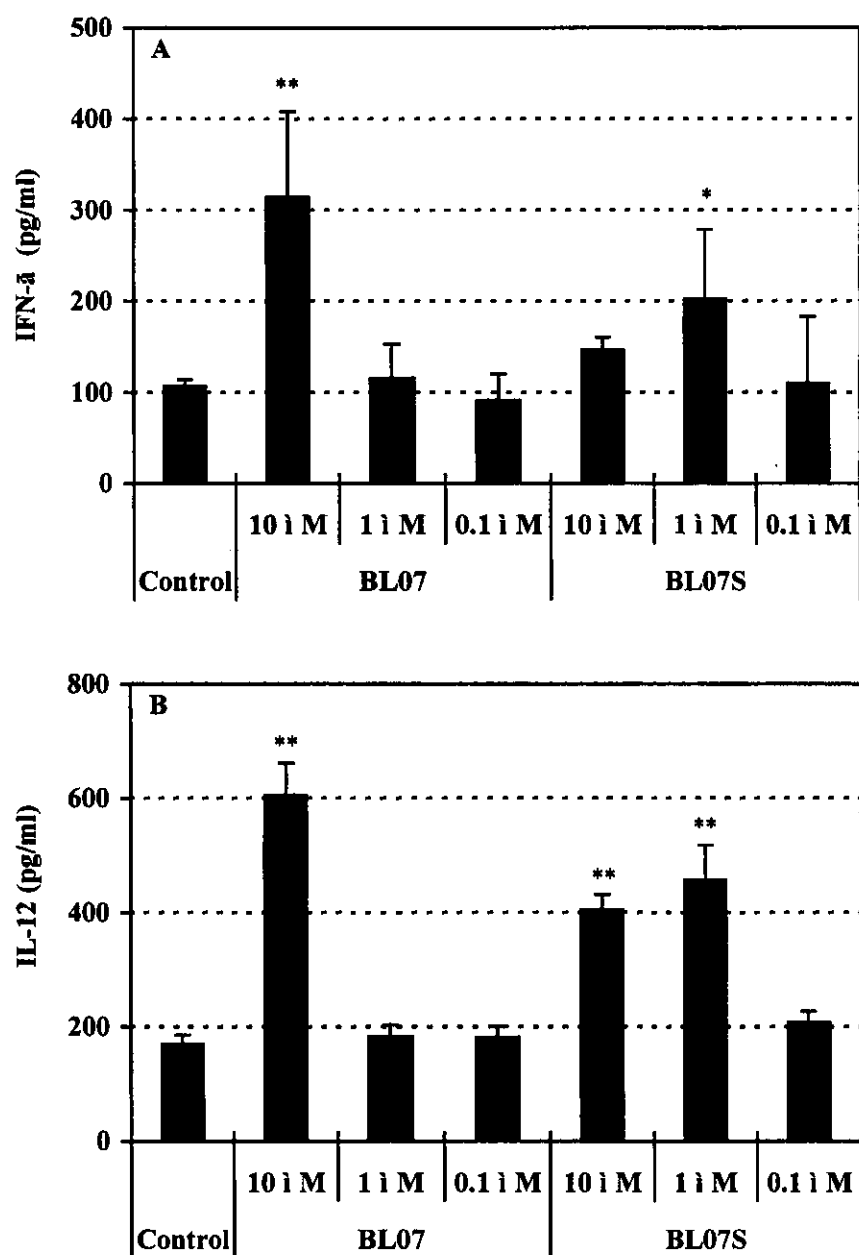


Fig. 2-8. Th1 cytokine levels in splenic cell cultures stimulated by ODNs. Splenic cells of BALB/c mice sensitized with OVA were cultured at 2.5×10^6 cells/ml with 100 ̑g/ml OVA in the presence of ODNs for 7 days. (A) IFN-̑; (B) IL-12. Data are shown as mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control.

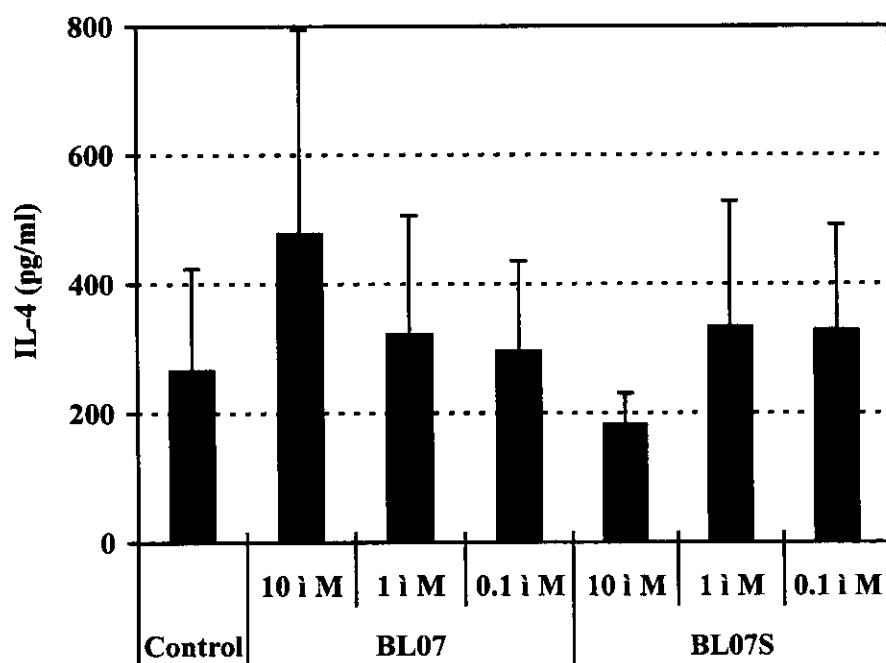


Fig. 2-9. IL-4 levels in splenic cell cultures stimulated by ODNs. Splenic cells of BALB/c mice sensitized with OVA were cultured at 2.5×10^6 cells/ml with 100 μg/ml OVA in the presence of ODNs for 7 days. Data shown represent mean \pm SD of 3 independent experiments.

Table 2-1. Immunoglobulin levels produced by purified B cells.

Group	IgE (ng/ml)	IgG1 (ng/ml)	IgG2a (ng/ml)
Control	19.8 ± 5.3	71.6 ± 15.9	ND (< 3.9)
BL07	10.9 ± 4.9 **	76.6 ± 13.1	14.4 ± 4.9
BL07S	4.3 ± 1.6 **	94.8 ± 36.1	11.6 ± 12.5

Purified splenic B cells of BALB/c mice were cultured at 2.0×10^6 cells/ml with 10 ng/ml IL-4 and 3 µg/ml anti-CD40 antibody in the presence of ODNs (10 µM) for 7 days. Data are shown as mean ± SD of 3 independent experiments. ** $p < 0.01$ compared to control. ND, not detected.

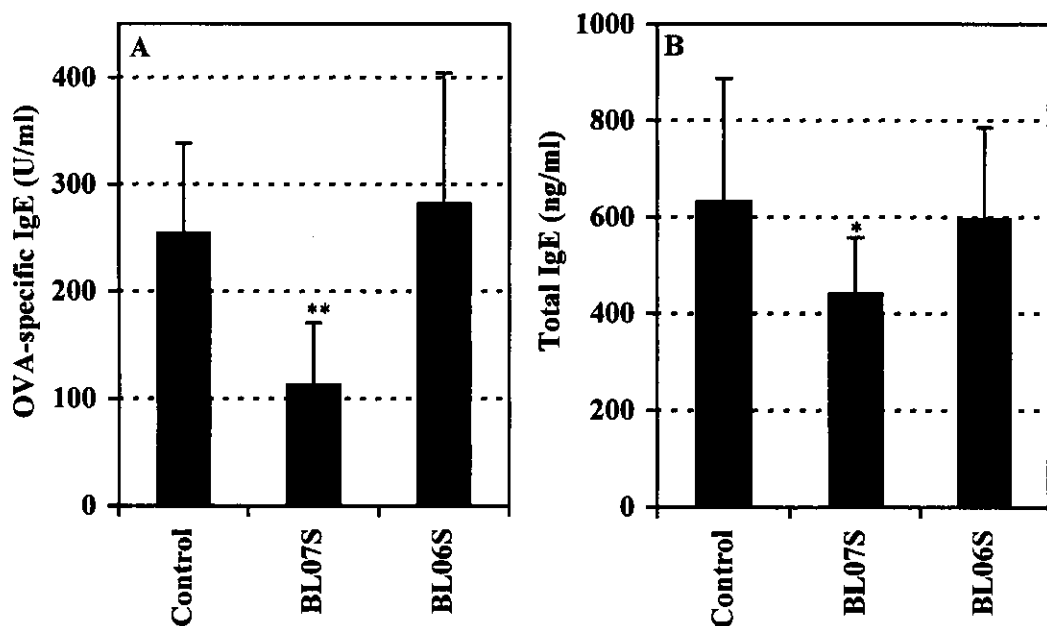


Fig. 2-10. ODN BL07S decreased IgE production in immunized mice.

Mice were immunized using OVA (20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) and ODN BL07S (10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) in alum at a 2-week interval. As controls, mice were administered OVA and PBS in alum. Blood was collected on day 21. (A) OVA-specific IgE; (B) total IgE. Data represent mean \pm SD from 6 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus controls.

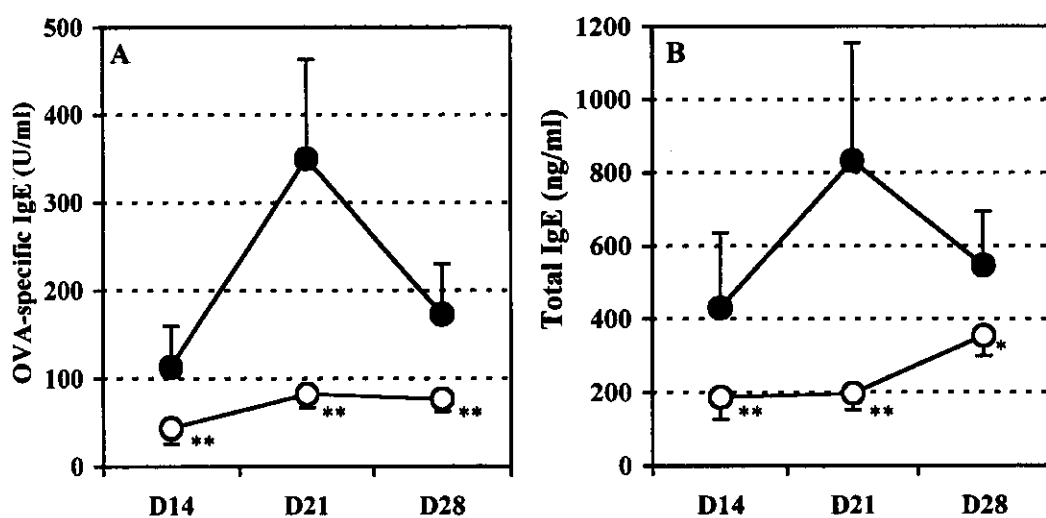


Fig. 2-11. Effects of ODN BL07S on total and OVA-specific IgE levels in serum of mice sensitised with OVA.

Mice were immunized as described in Fig. 4-4. (●) control group; (○) ODN BL07S group. (A) OVA-specific IgE; (B) total IgE. Data represent mean \pm SD from 8 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus controls.

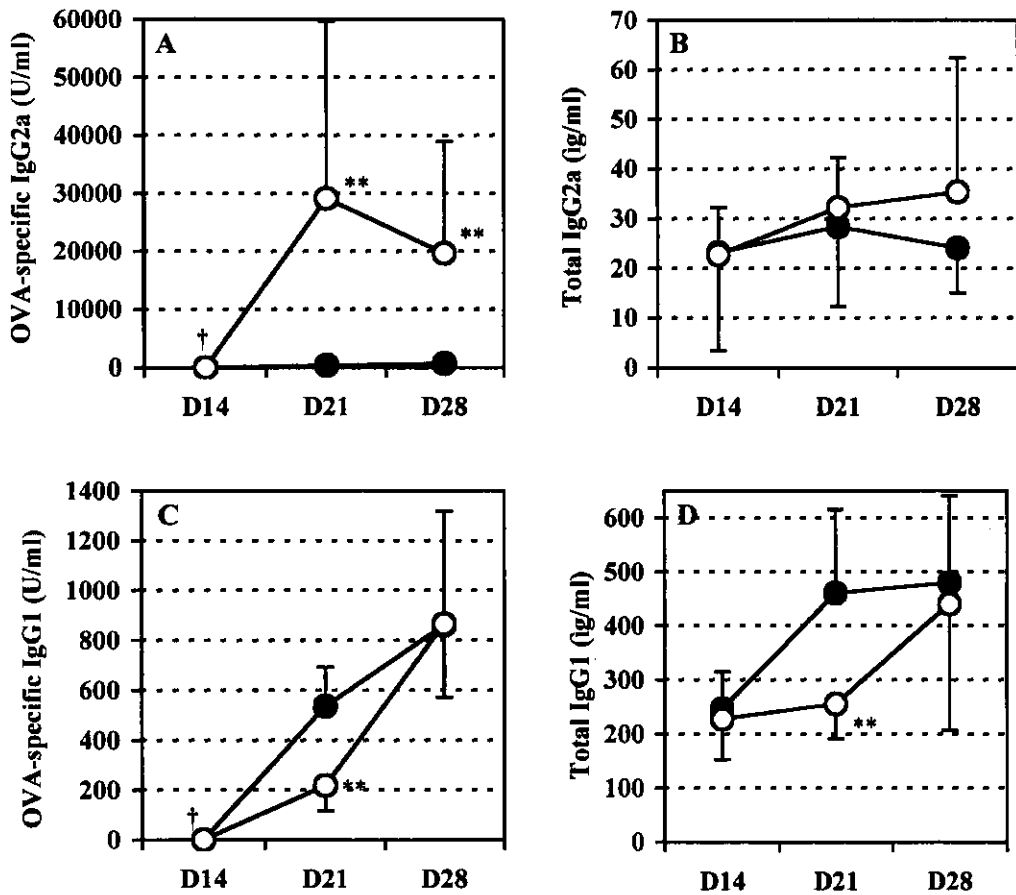


Fig. 2-12. Effects of ODN BL07S on total and OVA-specific IgG2a and G1 levels in serum of mice sensitized with OVA.

Mice were immunized as described in Fig. 4-4. (●) control group; (○) ODN BL07S group. (A) OVA specific IgG2a; (B) total IgG2a; (C) OVA-specific IgG1; (D) total IgG1. Data represent mean \pm SD from 8 mice per group. ** $p < 0.01$ versus controls. †; Below the limits of detection.

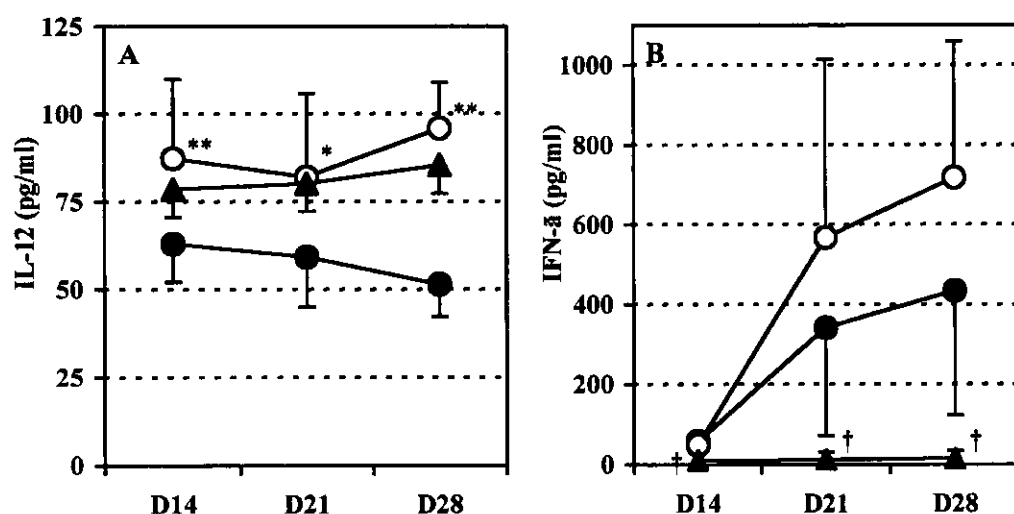


Fig. 2-13. Th1 cytokine levels in supernatants of cultured splenocytes from mice sensitized with OVA.

Mice were immunized as described in Fig. 4-4. Spleens were removed on day 14, 21 or 28 and single splenocytes were incubated with 100 μ g/ml OVA for 72 h. (●) Control group; (○) ODN BL07S group; (▲) Naïve group. (A) IL-12; (B) IFN- γ . Data represent mean \pm SD from 8 mice per group. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus controls. †; Below the limits of detection.

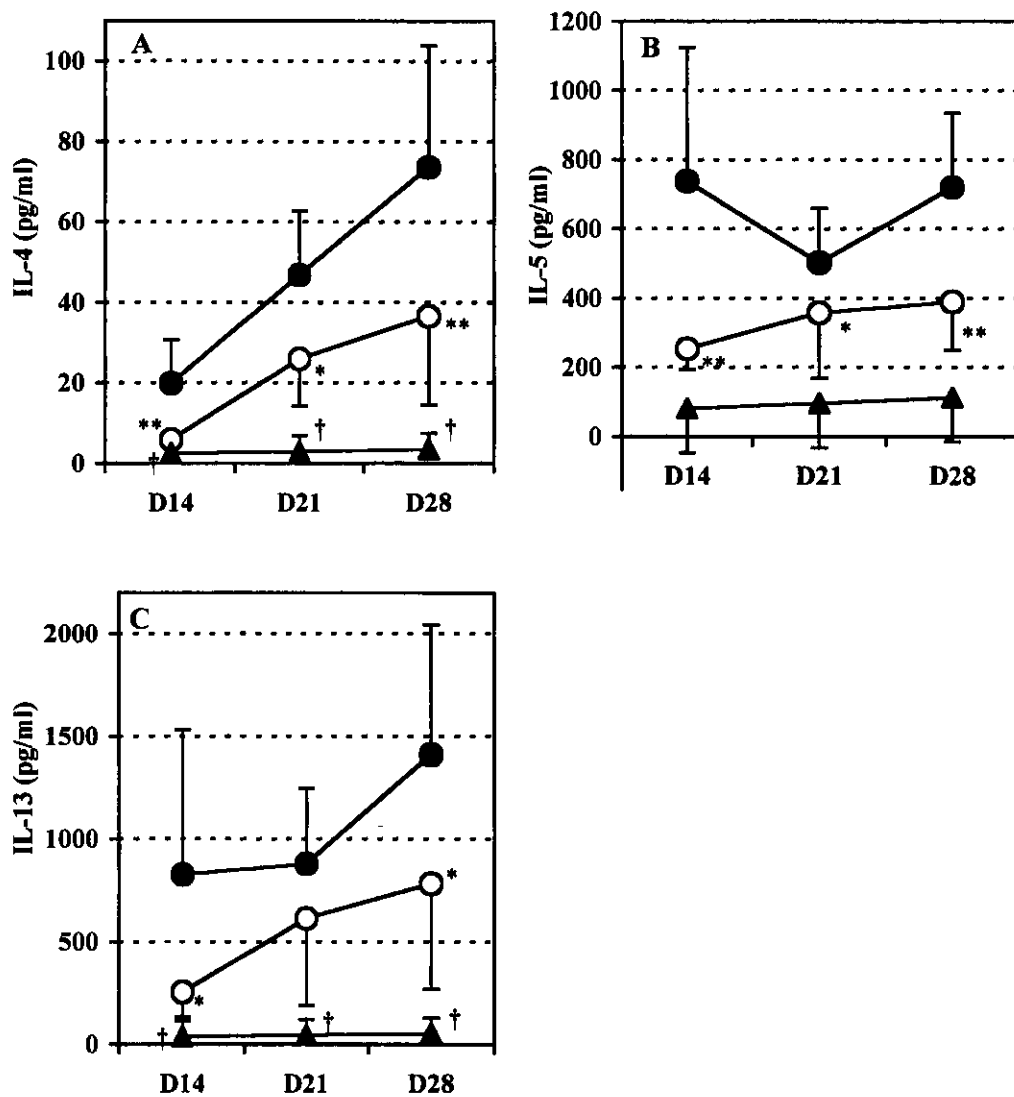


Fig. 2-14. Th2 cytokine levels in supernatants of cultured splenocytes from mice sensitized with OVA.

Mice were immunized as described in Fig. 4-4. Spleens were removed on day 14, 21 or 28 and single splenocytes were incubated with 100 μ g/ml OVA for 72 h. (●) Control group; (○) ODN BL07S group; (▲) Naïve group. (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IL-13. Data represent mean \pm SD from 8 mice per group. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus controls. †; Below the limits of detection.

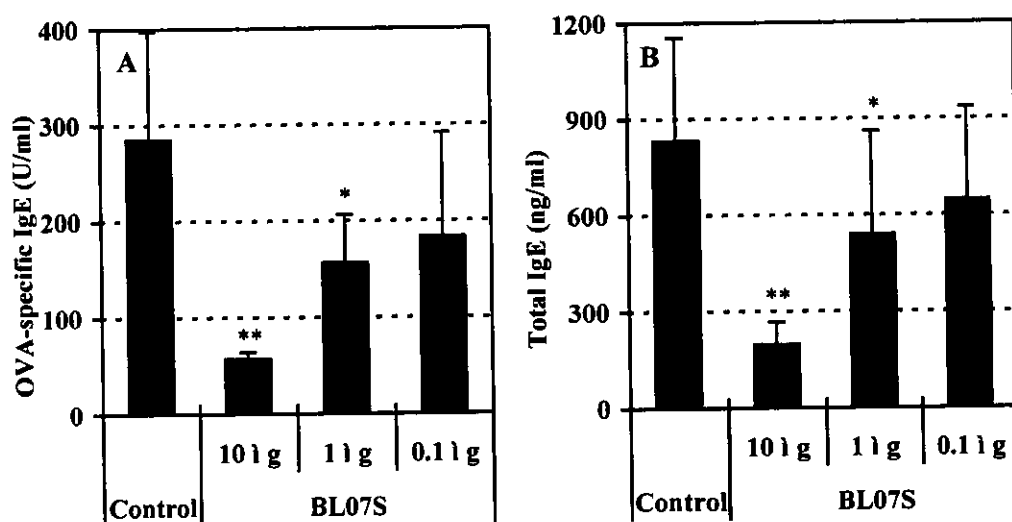


Fig. 2-15. Dose response of ODN BL07S on IgE levels in serum of mice.

Mice were immunized with OVA (20 µg/mouse) and ODN BL07S (0.1 µg, 1 µg and 10 µg/mouse) in alum at a 2-week interval. Sera were collected on day 21. (A) OVA-specific IgE; (B) total IgE. Data represent mean \pm SD from 8 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus controls.

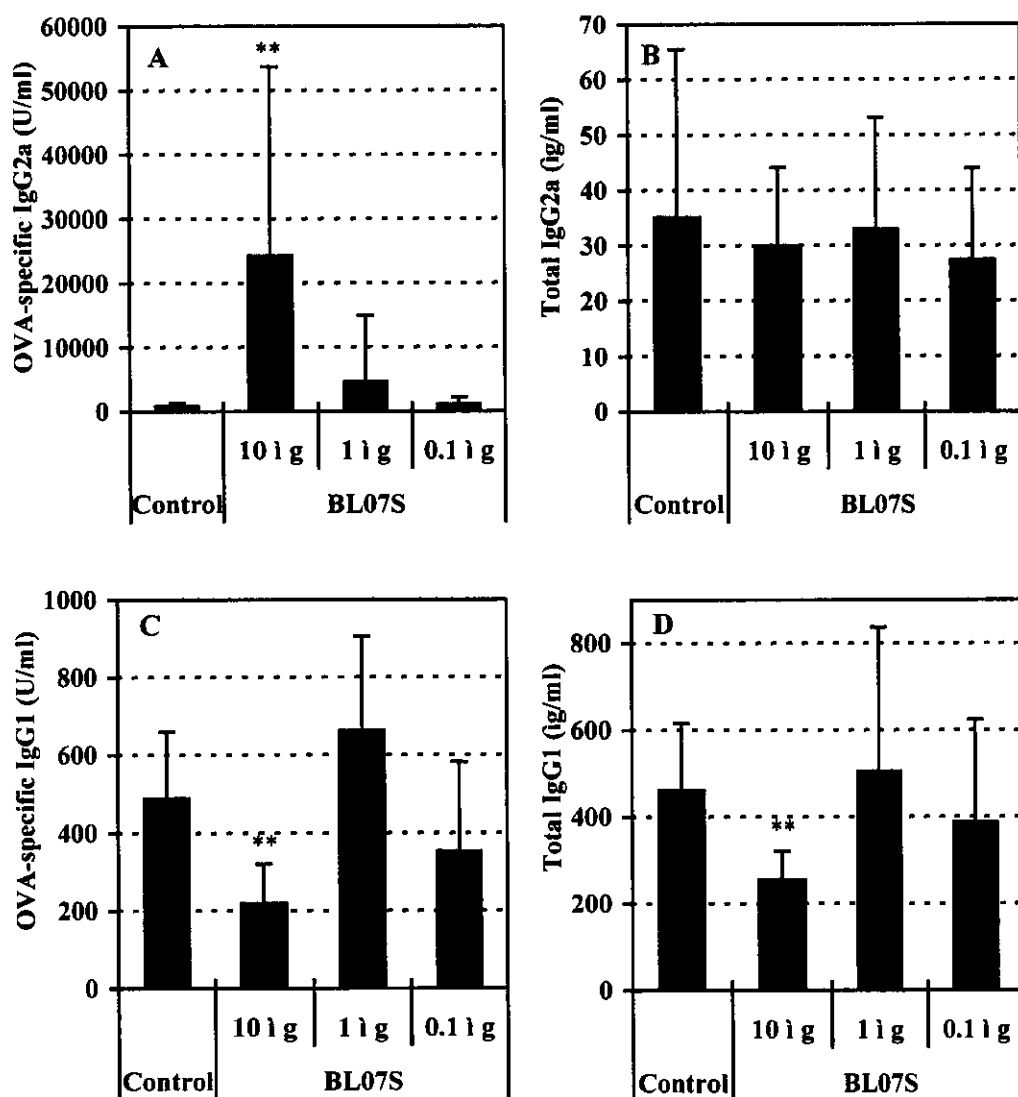


Fig. 2-16. Dose response of ODN BL07S on Ig levels in serum of mice. Mice were immunized as described in Fig. 4-9. Sera were collected on day 21. (A) OVA-specific IgG2a, (B) total IgG2a, (C) OVA-specific IgG1, (D) total IgG1. Data represent mean \pm SD from 8 mice per group. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus controls.

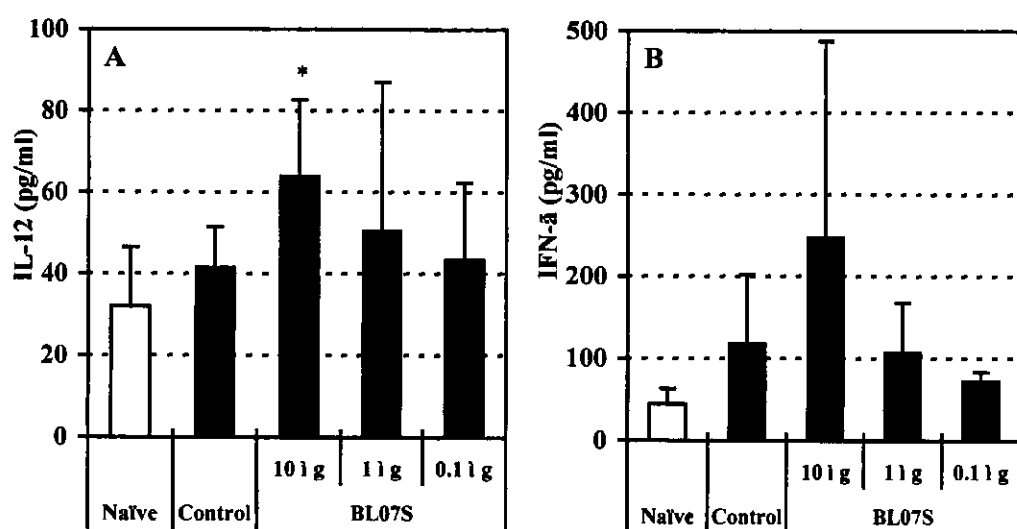


Fig. 2-17. Effects of ODN BL07S dose on Th1 cytokine production of mice.

Mice were immunized as described in Fig. 4-9. Spleens were removed on day 21 and single splenocytes were incubated with 100 μg/ml OVA for 72 h. (A) IL-12; (B) IFN-γ. Data represent mean ± SD from 8 mice per group. * $p < 0.05$ versus controls.

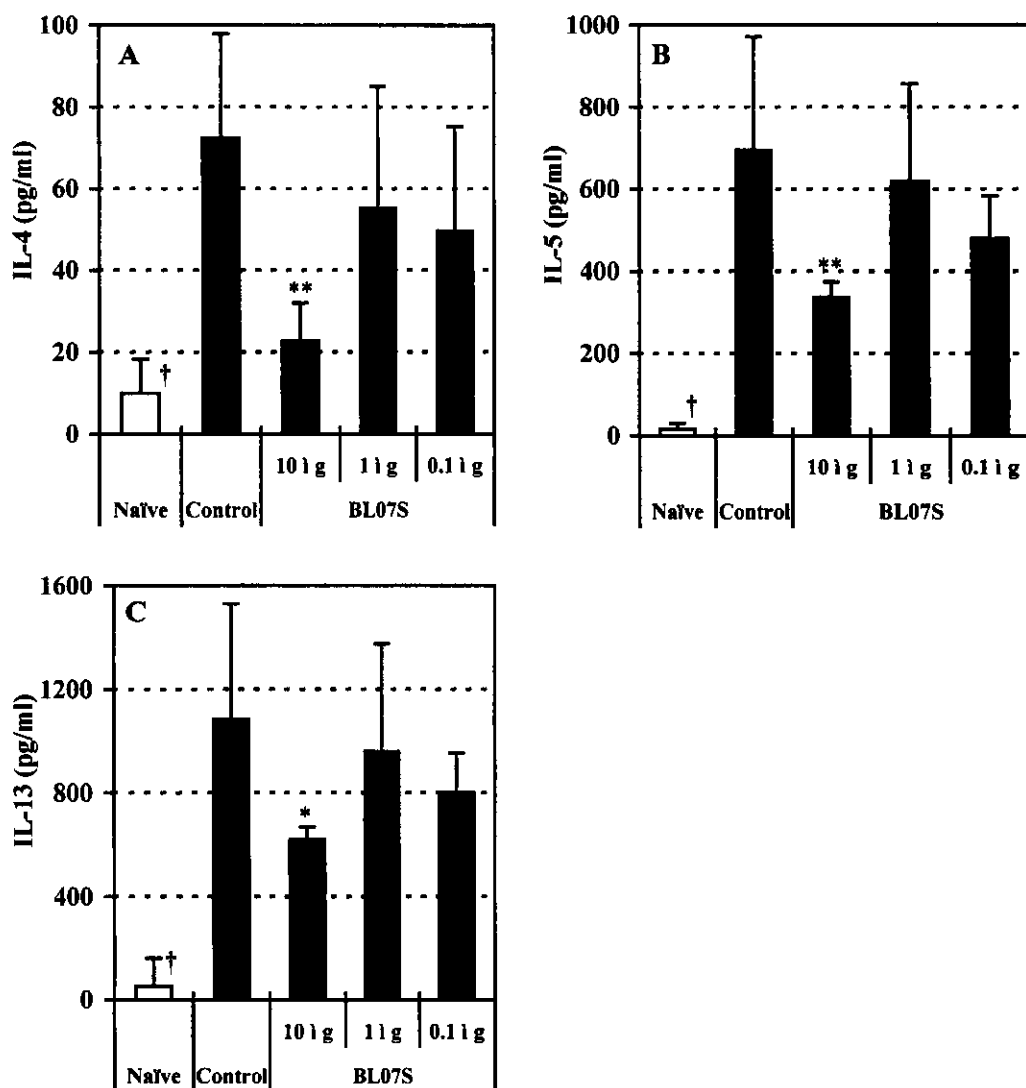


Fig. 2-18. Effects of ODN BL07S dose on Th2 cytokine production of mice.

Mice were immunized as described in Fig. 4-9. Spleens were removed on day 21 and single splenocytes were incubated with 100 μg/ml OVA for 72 h. (A) IL-4; (B) IL-5; (C) IL-13. Data represent mean ± SD from 8 mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus controls. †; Below the limits of detection.

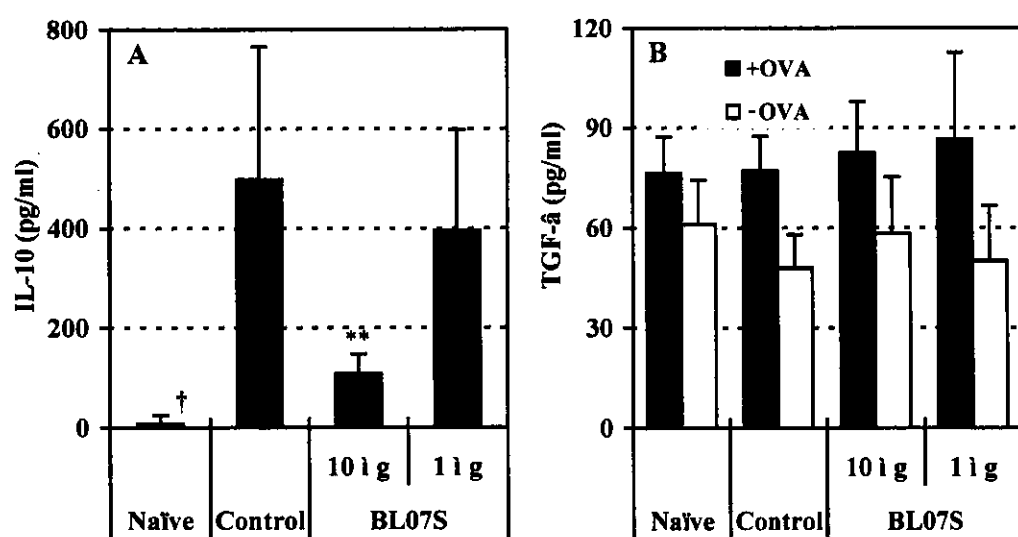


Fig. 2-19. IL-10 and TGF- α levels in supernatants of cultured splenocytes.

Mice were immunized with OVA (20 μ g/mouse) and ODN BL07S (1 μ g or 10 μ g/mouse) in alum at 2-week intervals. Spleens were removed on day 21 and single splenocytes were incubated with or without 100 μ g/ml OVA. (A) IL-10; (B) TGF- α . Data represent mean \pm SD from 6 mice per group. ** p < 0.01 versus controls. †; Below the limits of detection.

Table 2-2. The rate of CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cell in splenocytes.

Group		CD3⁺CD4⁺ cells	CD3⁺CD4⁺CD25⁺ cells
Naïve		22.71 ± 1.88	1.28 ± 0.19
Control		25.40 ± 2.73	1.34 ± 0.23
BL07S	1 µg	25.81 ± 0.80	1.41 ± 0.24
	10 µg	27.14 ± 0.23	1.40 ± 0.18

Spleens were removed on day 21 and single splenocytes were stained with anti-mouse PE Cy5 -CD3, PE -CD4 and FITC -CD25 monoclonal antibodies. The values were shown as the percentage of CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells in prepared splenocytes. Data represent mean ± SD from 6 mice per group.

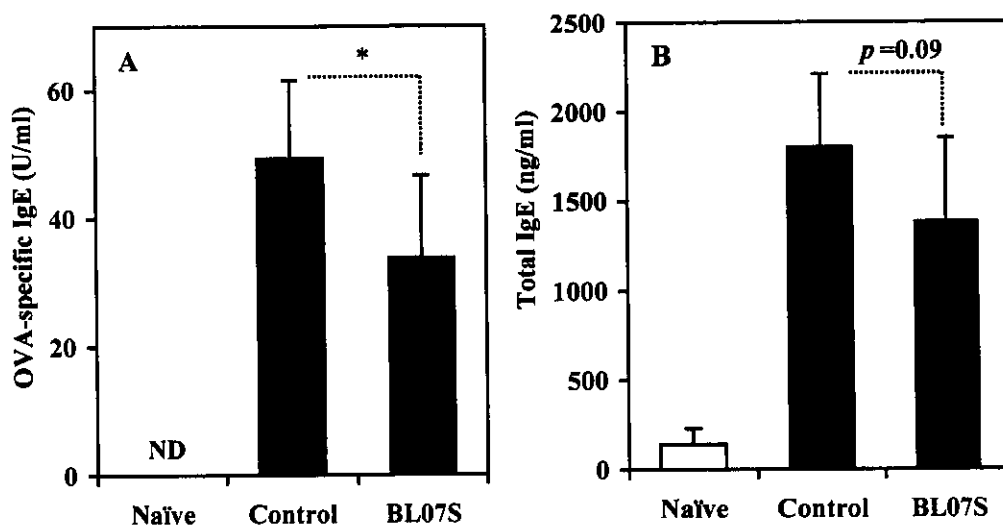


Fig. 2-20. ODN BL07S inhibited IgE production in OVA-primed BALB/c mice. Mice were immunized using OVA (10 µg) in alum on day 2 and 12. ODN BL07S (1 mg) was administrated by gastric gavage on day 0 to 2 and 7 to 9 in ODN group. PBS was given to naïve and control group.
 (A) OVA-specific IgE; (B) total IgE. Data are shown as mean ± SD from seven mice per group. * $p < 0.05$ versus controls. ND, not detected.

Table 2-3. Effects of ODN BL07S on IgG2a and IgG1 production in OVA-primed BALB/c mice.

			Naïve	Control	BL07S
Total	IgG2a	(μ g/ml)	43.6 \pm 38.3	95.9 \pm 39.0	150.2 \pm 36.8
	IgG1	(μ g/ml)	145.2 \pm 66.7	2618 \pm 599.2	2119 \pm 1003
OVA-specific	IgG2a	(U/ml)	ND	68.5 \pm 39.1	140.4 \pm 60.9
	IgG1	(U/ml)	ND	51.3 \pm 8.3	44.1 \pm 15.5
Th1/Th2 balance ratio (OVA-specific IgG2a/IgG1)			—	1.30 \pm 0.64	3.53 \pm 2.29

Immunization and administration of ODN were performed as described in Fig. 4-14. Blood was collected on day 20. Data are shown as mean \pm SD from 7 mice per group. * p < 0.05 versus controls. ND, not detected.

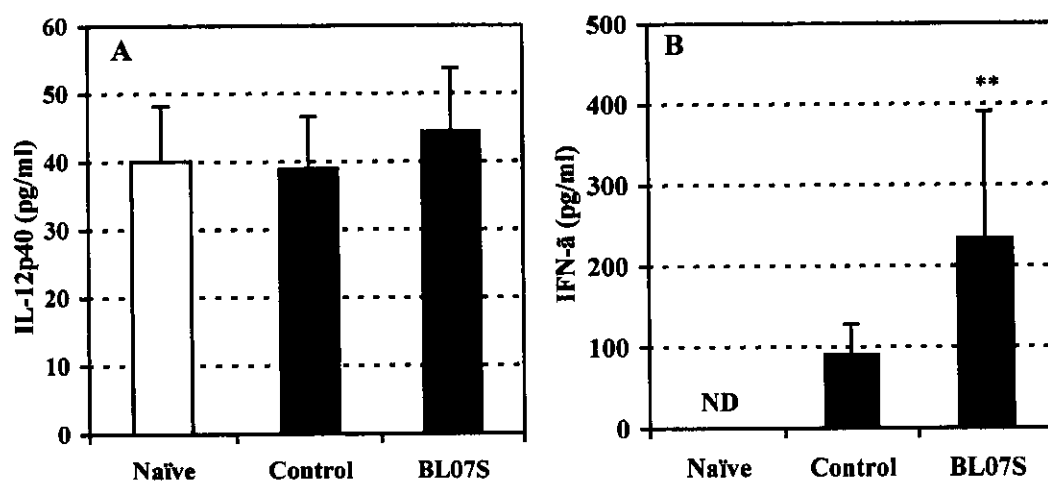


Fig. 2-21. Th1 cytokine levels in supernatants of cultured splenocytes from mice sensitized with OVA.

Immunization and administration of ODN were performed as described in Fig. 4-14. Spleens were removed on day 20 and single splenocytes were incubated with 100 μ g/ml OVA for 72 h. (A) IL-12p40; (B) IFN- γ . Data are shown as mean \pm SD from 7 mice per group. ** $p < 0.01$ compared to control. ND, not detected.

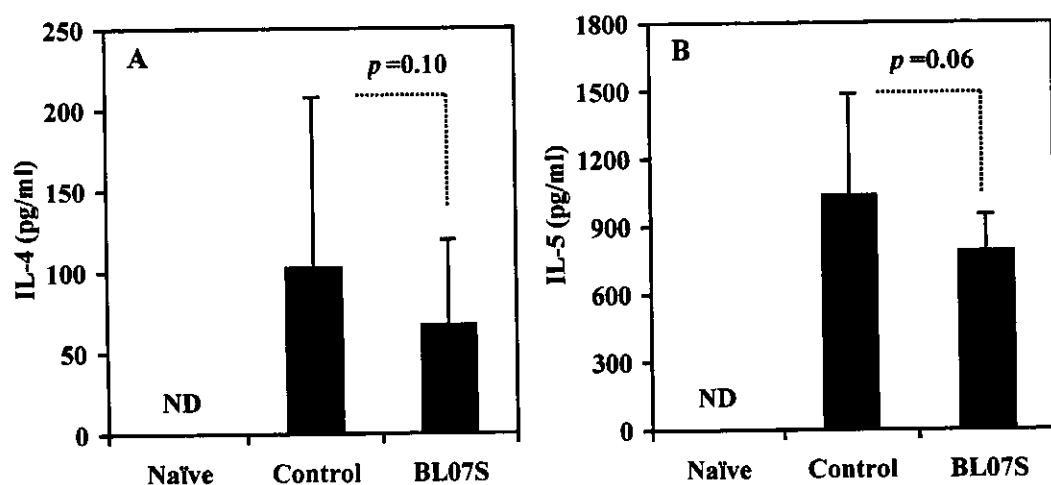


Fig. 2-22. Th2 cytokine levels in supernatants of cultured splenocytes from mice sensitized with OVA.

Immunization and administration of ODN were performed as described in Fig. 4-14. Spleens were removed on day 20 and single splenocytes were incubated with 100 μ g/ml OVA for 72 h. (A) IL-4; (B) IL-5. Data are shown as mean \pm SD from 7 mice per group. ND, not detected.

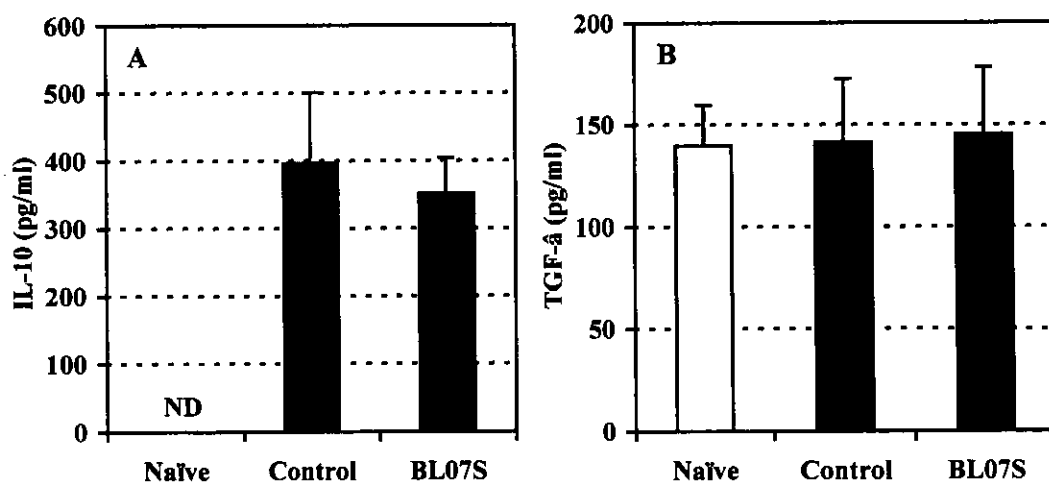


Fig. 2-23. IL-10 and TGF- α levels in supernatants of cultured splenocytes from mice sensitized with OVA.

Immunization and administration of ODN were performed as described in Fig. 4-14. Spleens were removed on day 20 and single splenocytes were incubated with 100 μ g/ml OVA for 72 h. (A) IL-10; (B) TGF- α . Data are shown as mean \pm SD from 7 mice per group. ND, not detected.

3. 考察

probiotics の DNA 成分の生理活性に関してはここ数年急速に関心が高まっており、医学研究者による進歩的な論文が続々と発表されている。数種類から成る probiotics VSL#3 由来のゲノム DNA が、炎症性大腸炎のモデルマウスに効果を示し、その効果は TLR9 を介したものであることが明らかにされた [34]。さらに投与された DNA は実際にマウス体内に取り込まれることも示されている。このような報告からも、研究者達の注目が集まってきている研究分野であると言える。bifidobacteria のゲノム DNA が示す免疫調節作用に関する報告は少なく、唯一ゲノム DNA が制御性サイトカインの一つである IL-10 を誘導した報告 [35] があるのみである。bifidobacteria はヒト腸管においていわゆる善玉菌の中でも最優勢菌種であるにも関わらず、その研究は皆無であった。

これまでに probiotics の中でも、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Streptococcus thermophilus* のゲノム DNA より、免疫刺激性を有した CpG-like および CpG-like motif を有さない non-CpG の ODN 配列は、既に Kitazawa らによって報告されていた [36-39]。しかしながら、前述の通り、bifidobacteria においてはそのゲノム DNA 中からの免疫刺激性配列は未知のままであった。本研究において、3 つの CpG 結合を含む配列 5' -GCGTCGGTTTCGTTGCTCAC-3' から成る ODN BL07 を *Bifidobacterium longum* BB536 のゲノム DNA から同定した。この ODN BL07 は、マウスの脾臓 B リンパ球を刺激し、またマウスマクロファージ様細胞である J774.1 より、Th1 type cytokine である IL-12 を誘導した。これら ODN BL07 が示す免疫活性は、LPS によるコンタミネーションに拠るものではないことを確認しており、また、その配列は既報の免疫刺激性配列との相同性も認められないことから、ODN BL07 は新規な免疫刺激性配列であることが示唆された。

公開されているゲノムデータベース [40] を検索した結果、*Bifidobacterium longum* NCC2705 ゲノム配列中にはこの ODN BL07 は 1 箇所存在していた。また、最近、森永乳業(株) 保有の *Bifidobacterium longum* BB536、*Bifidobacterium breve* M-16V および *Bifidobacterium infantis* M-63 のゲノム配列が決定され、これら 3 菌株のゲノム配列中にも ODN BL07 の配列がそれぞれの菌株で 1 箇所のみ存在していた (unpublished results)。しかしながら、公開されている lactobacilli や streptococci のゲノム中には存在しておらず、この配列は bifidobacteria に特有の配列である可能性がある。

免疫刺激性配列では CpG motif を有した配列が古くから研究されており、GACGTT が mouse optimal motif、GTCGTT が human optimal motif であるとされて来た [41-42]。近年になり、optimal motif の有無や塩基間の結合であるリン酸ジエステル結合部への修飾の有無により、CpG motif を含む免疫刺激性配列では、A-class、B-class および C-class の 3 つのタイプが提唱されている [43]。A-class は NK 細胞の活性化や IFN- α 誘導を示す ODN であり、B-class は optimal motif を含み B 細胞の活性化を示す ODN である。C-class はこれら 2 つの性質を併せ持つ ODN である。これらの CpG ODN は全てヌクレアーゼ耐性を付与したフォスフォロチオエート修飾体であるため、ナチュラルなリン酸ジエステル結合のみの ODN BL07 は、どのクラスにも分類はされ得ない。しかしながら、ODN BL07 のフォスフォロチオエート修飾体である ODN BL07S は、ODN BL07 よりも強いマウス B 細胞刺激活性を示した (data not shown)。さらに、ODN BL07 は CpG 結合を 3 つ有することから、B-class に属し得る免疫刺激性配列であると推測される。

本研究において、bifidobacteria 由来のゲノム DNA およびその一成分である ODN が、リンパ球幼若化活性を示すことを初めて明らかにした。現時点でゲノムシーケンスの終了している bifidobacteria は限定されるが、今後これら

情報の蓄積が進めば、ゲノム配列の情報を利用した切り口から probiotics DNA の免疫賦活化機構の解明が行われることが予想される。実際、Shimosato らは *Lactobacillus gasseri* OLL2716 のゲノム配列を利用して新規な免疫刺激性配列配列およびその活性に必要な構造を提唱した [44]。本研究においても、非常に限定された範囲ではあるが、シーケンスを決定した配列部分と、ポジティブコントロールとして用いた CpG1826 配列との相同性解析を行い、有意なマウスリンパ球幼若化活性を示す ODN BL21 (5' -TCAAGGACGTGCCTGACGCT-3') も同定している (data not shown) 。ODN 単位での研究は、化学合成品を中心に精力的に行われており、各種哺乳動物での optimal motif が提唱されていることは既に述べた。しかしながら、現時点では、配列からその活性を予測することは不可能である。本研究でも ODN BL07 をベースとしたさらに短い ODN のリンパ球幼若化活性を測定したが、ODN BL07 よりも 3 mer 短くなるだけで活性は極端に低下し、その活性に強く関与する様な配列、すなわち motif を見出すことはできなかった。また、シトシンの 5' 位をメチル化することで、ODN BL07 中に 3 つある CpG 結合の内、どの部分がその活性に大きく寄与するののかも検討したが、大きな差を示すデータは得られなかった (data not shown) 。最近、ODN 単位ではその 2 次構造が活性に強く影響すると報告され [45]、免疫刺激性 ODN の研究が進むにつれて、ODN BL07 の免疫刺激機構が立体化学的に解明される可能性もある。さらには、ゲノム情報を利用した免疫刺激性配列単位での多元的な検討により、BB536 ゲノム DNA 全体の免疫調節作用を含めた生理活性を明らかに出来る可能性があるが、これらは今後の検討課題である。

本結果から、免疫刺激性配列 ODN BL07 は、CpG motif を認識する受容体 TLR9 を発現する自然免疫担当細胞を介してその生理活性を示すことが示唆された。probiotics の細胞壁成分は TLR2 によって認識される。TLR が発見されるまで、自然免疫系の反応は非特異的と考えられていたが、実は TLR を用いて特異的に

外来微生物を認識していること、さらに、哺乳動物では TLR を介して自然免疫が獲得免疫の成立を支配していることが明らかにされた。これら知見により、probiotics を用いて TLR を刺激することにより、自然免疫を介して獲得免疫に働きかけることにより、特定の免疫疾患をターゲットとした予防・治療の可能性が示唆されている。

I 型アレルギーは、アレルゲンに対する特異的 IgE がその反応の引き金となっている。IgE のレセプターである FcεRI はマスト細胞だけでなく、好酸球などの顆粒球においても発現している。これら細胞上の FcεRI への結合およびアレルゲンの再暴露は、IL-4 の誘導および CD40 リガンド発現の増強を促進し、さらに B 細胞からの IgE の産生を促進して血清中の IgE が増加することになり、アレルギー症状発症のリスクは増大する。従って、花粉症をはじめとする I 型アレルギーの評価には、上述の症状発症および憎悪への機序から、IgE を低く抑えることが重要なファクターとなっている。本研究においては、以上の観点から、*in vitro* および *in vivo* における BB536 由来の免疫刺激性配列である ODN BL07 の抗アレルギー作用の指標としては、IgE をキーパラメーターに据えて実験を進行した。また、その IgE 産生抑制の作用機序検討としては、Th1 および Th2 cytokine の評価、加えて *in vivo* においては血清中の IgG1 (Th2 associated) および IgG2a (Th1 associated) の評価を行った。

in vitro において、ODN BL07 はそのフォスフォロチオエート修飾体である BL07S も含め、OVA 感作 BALB/c マウスの脾臓細胞を用いた Th2 偏向モデルにおいて、PBS 添加のコントロールと比較し total IgE の産生を有意に抑制し、*in vitro* における I 型アレルギーにおける抗アレルギー作用が示唆された。細胞培養液中の Th1 cytokine である IFN-γ および IL-12 は、ODN BL07 の添加によって、コントロールと比較して有意な誘導値を示した。しかし、B 細胞からの

IgE 産生に深く関与する Th2 cytokine である IL-4 に関しては、ODN BL07 添加群とコントロールとの間で統計学的な差は認められなかった。これらの結果から、*in vitro*における ODN BL07 の IgE 産生抑制作用は、Th1 cytokine の増加によって Th2 cytokine が減少する Th1/Th2 balance の経路ではなく、他の作用経路によって起こることが推察された。Liu ら [46] は、*in vitro*におけるマウス由来精製 B 細胞を用いた IgE 産生モデルにおいて、CpG ODN が直接 B 細胞に作用し、Ig の Th2 type クラススイッチを抑制することを報告している。本研究においても、同様の作用機序が考えられたため、MACS を用いて高度に精製した BALB/c マウス脾臓由来の B 細胞を用いて、recombinant IL-4 および anti-CD40 を添加する強制 IgE 産生系において、ODN BL07 の作用機序の検討を実施した。その結果、ODN BL07 および BL07S とともに、B 細胞での IgE 産生をコントロールと比較して有意に抑制し、またコントロールでは検出されなかった IgG2a を誘導し、*in vitro*の本実験系においては B 細胞へ直接作用して IgE の産生を抑制することが示唆された。

本研究における *in vivo* の実験系において、ODN は全てフォスフォロチオエート修飾体 [47] である ODN BL07S を使用した。同修飾体は、ナチュラルなフォスフォジエステル結合と比較して、ヌクレアーゼ耐性が非常に高く、ODN の配列そのものの生理活性を正確に評価することが可能である。通常フォスフォジエステル結合の ODN では、実験系の内因性ヌクレアーゼにより著しい分解を受け、配列そのものの生理作用を正確に評価することが難しい。本研究においても、ODN BL07 の免疫担当細胞への到達性を考慮し、ODN BL07S を使用した。

*in vivo*での OVA 感作 BALB/c マウスの Th2 偏向モデルにおいて、ODN BL07S の皮下投与は PBS 投与のコントロールと比較し、OVA 特異的 IgE および total IgE の産生を有意に抑制した。加えて、ネガティブコントロールとして使用し

た免疫刺激性を示さない ODN BL06S は、コントロールとの IgE 産生値に差がなかったことから、ODN BL07S の *in vivo*（皮下投与）の I 型アレルギーにおける抗アレルギー作用が示唆された。これまでに、CpG ODN を使用した同様の報告 [48] はあるが、IgE 産生抑制が ODN 投与のどの時期から誘導されるかを詳細に検討した報告は無い。そこで、本研究では Ig および脾臓細胞からの cytokine 誘導において、詳細な検討を行った。その結果、IgE 産生抑制は 2 回目の抗原感作前である D14 から生じており、2 回目感作日の 1 週間後である D21 に最も低値を示した。Th2 cytokine である IL-4 は D14 から D28 まで全期間コントロールと比較して有意に抑制されており、IgE の産生抑制に深く関与していることが示唆された。これら cytokine の変動は、D21 および D28 での OVA 特異的 IgG2a の有意な高値、ならびに D21 での OVA 特異的 IgG1 の有意な低値に繋がったものと推測される。また、Th1 cytokine である IL-12 は全期間でコントロールと比較して有意に高い値を示した。しかしながら、IFN- γ は D21 および D28 でコントロールより高値を示したものの、有意差は認められなかった。

ODN BL07S の IgE 産生抑制作用に関してさらに詳細な検討を行うため、0.1、1.0 および 10 μ g/mouse の投与量での用量依存性試験を実施した。全ての測定は、前検討で最も IgE の差が認められた D21 において行った。OVA 特異的および total IgE は 1.0 および 10 μ g/mouse 投与量で ODN 群では有意に低い値を、0.1 μ g/mouse は低値を示し、IgE に関する用量依存性が認められた。また、OVA 特異的 IgG2a、IgG1 および total IgG1 は 10 μ g/mouse 投与量のみで群間での有意差が認められ、0.1 および 1.0 μ g/mouse 投与量では差がなかった。脾臓細胞からの cytokine 誘導では、IFN- γ 以外の cytokine で前検討と同様に 10 μ g/mouse 投与量のみで群間での有意差が認められ、0.1 および 1.0 μ g/mouse 投与量では差がなかった。しかしながら、以上の結果において 0.1 および 1.0 μ g/mouse 投与量におけるデータをまとめると、OVA 特異的および

total IgE は有意に抑制されているにも関わらず、Th1 および Th2 cytokine における誘導値にコントロールとの差が認められなかった結果となる。この結果は、皮下投与における ODN BL07S の IgE 産生抑制作用は、Th1 cytokine の誘導や Th2 cytokine 産生の抑制、もしくは Th1/Th2 balance 経路以外の作用機序の存在を示唆している。

近年、IgE 産生抑制や IL-4 などの cytokine 誘導を含む一連の Th2 反応の抑制機構として、制御性 T 細胞 (regulatory T cell、以下 Treg) [49-50] の関与が推測されている。Treg はその産生する cytokine の種類などにより幾つかに分類されてもいるが、未だ詳細な誘導機構や、IgE 産生および Th2 反応抑制への作用機序は明らかとなっていない。Treg が産生する制御性サイトカインとして、IL-10 [51] および TGF- β [52] が、また T 細胞のサブセットとしてヘルパー T 細胞の中でも転写因子 *foxp3* によって規定される CD4⁺CD25⁺細胞 [49] が注目されている。CpG ODN においても、Th1 cytokine を介さない Th2 反応抑制機構の詳細は明らかとなっていないが、既に *in vivo* において Th1 cytokine である IL-12 および IFN- γ のノックアウトマウスを使用して、これら 2 種のサイトカインが CpG ODN の Th2 反応抑制に必須では無いことが示されている [53]。また、最近になり、CpG ODN で刺激したヒト樹状細胞を用いた CD4⁺CD25⁺ T 細胞誘導が示されており [54]、免疫刺激性配列における Th1 非依存的な Th2 抑制機構が示唆されている。本研究においても、ODN BL07S 皮下投与における、これら 2 種の制御性 cytokine ならびに脾臓細胞における CD4⁺CD25⁺ T 細胞の発現量を検討した。その結果、IL-10 に関しては ODN 群でコントロールよりも有意に低い値を示し、本研究においては、IL-10 は Th2 細胞が産生する Th2 cytokine が主であり、誘導される IFN- γ によって抑制されるものと推測された。一方で TGF- β は naïve、control および ODN 群で同等の値を示し、IgE 産生抑制への関与は否定された。また、フローサイトメトリー

分析による脾臓細胞中の CD4⁺CD25⁺T 細胞比率の結果も、3 群で同等の値を示し、こちらでも IgE 産生抑制への関与は否定された。従って、低濃度における ODN BL07S の IgE 抑制作用は、有意では無いものの、ODN BL07S が持つ Th2 cytokine、おもに IL-4 の抑制作用に起因するものと推測されるが、今後更なる検討が必要である。

probiotics は、発酵乳をはじめとする食品の形態で様々な生理作用を期待し、ヒトにおいては経口摂取される。従って、その生理作用は腸管関連リンパ組織 (GALT: gut associated lymphoid tissue) を介して発揮されるものと推測されている [55]。本研究においても、GALT を介した ODN BL07S の抗アレルギー作用について興味を持たれた。CpG ODN においては、抗原感作モデル動物を使用したその経口投与による IgE 産生抑制は無かったが、単回投与において血中への Th1 cytokine が誘導されることは報告されていた [48, 56]。通常、食品由来の成分では、動物実験での経口投与で血中へ検出可能なレベルまでの Th1 cytokine が誘導されることは殆ど無く、これは CpG ODN が持つ強力な Th1 誘導能に起因するものと推察される。そこで、経口投与の検討を始めるに当り、BALB/c マウスへの ODN BL07S の経口投与による、血清中への IL-12p40 誘導能を測定した。ODN BL07S を 7 週齢雌 BALB/c マウス 1 匹当たり 10、100 μ g および 1 mg を単回投与した結果、投与後 5 時間後に 1 mg 投与群において、血中より IL-12p40 を検出した (377.4 ± 73.0 pg/ml)。この結果より、1 mg の投与量における Th1 誘導が示唆されたため、経口投与における 1 回当たりの投与量を 1 mg/mouse とし、計 6 回投与することで IgE 産生の抑制作用を検討した。その結果、ODN 群では、コントロールと比較して有意に低い OVA 特異的 IgE 値を示し、その IgE 産生抑制作用が示唆された。血清中の OVA 特異的 IgG2a/IgG1 スコア (Th1 associated/Th2 associated) を Th1/Th2 バランススコアとして評価した場合、ODN 群ではコントロールと比較して有意に高い値、すなわち元来 Th2

偏向であるモデル系を Th1 側に誘導していることが示唆された。以上の結果により、ODN BL07S の経口投与による抗アレルギー作用が示唆された。

本研究において、ODN BL07S の投与経路は皮下投与ならびに経口投与の 2 経路の検討を実施した。OVA 特異的 IgE の産生抑制は、皮下投与では 10 μ g/mouse で 2 回、すなわち計 20 μ g で有意な低下が見られた。これに対し、経口投与では 1 mg/mouse で 6 回、すなわち計 6 mg で有意な低下が観察された。薬剤的な投与方法である皮下投与では、少ない dose での抗アレルギー作用が見られたが、有意な IFN- γ の増加は見られず、作用機序にも今後の検討課題を残した。一方で、経口投与の場合は、有意な IFN- γ の増加に伴う OVA 特異的 IgE の産生抑制が観察された。腸管免疫システムにおける ODN BL07S の作用機序は今後の検討課題ではあるが、本研究結果は薬剤的な投与経路でなくとも、食品の摂取形態である経口摂取によって probiotics の菌体一成分が、抗アレルギー作用を示したものである。これは、ODN BL07S のような probiotics を含む食品がその日常的な摂取により、免疫調節作用を発揮し得る可能性を示唆している。

本研究は、probiotics の菌体構成成分を使用した経口投与実験において、抗アレルギー作用を示した初めての研究であり、今後の probiotics における免疫調節作用研究の発展の一助となることを期待している。

4. まとめ

喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーおよび花粉症などのアレルギー疾患が近年著しく増加しており、社会問題となっている。とくに、日本における I 型アレルギーであるスギ花粉症では、国民の約 20%が罹患しているとも言われる。これらアレルギー疾患のはっきりとした原因は解明されていないが、アレルギー疾患の増加している先進工業国においては、環境微生物からの免疫系への刺激の減少が、アレルギー急増の原因と推測されている。この考え方は、Strachan により「衛生仮説」[7] として発表され、この学説を参考にして近年、probiotics を用いたヒト臨床試験におけるアレルギー疾患予防や治療効果が報告され始めた。I 型アレルギーに関与する IgE 低減作用のある probiotics としては、動物実験レベルでは、*Lactobacillus* 属 [13-14]、*Lactococcus* 属 [57] および *Bifidobacterium* 属 [58] 等が報告されている。また、ヒト臨床試験においては、日本での花粉症試験において、*Enterococcus* 属 [59] および *Lactobacillus* 属 [60-61] で抗アレルギー作用が報告されている。アレルギー疾患に対しては、発症してからは抗ヒスタミン薬やステロイド剤による対症療法が主であり、副作用に悩まされる罹患者も多い。probiotics を用いた発酵食品のような形態で、日常生活に根付いた形でのアレルギー低減を実現できることになれば、薬剤に頼らない新しい予防医学の方向性が提示可能となる。前述の研究成果を基にして、日本では、2003 年に花粉症改善作用を示す probiotics を使用した発酵乳製品が発売され、「アレルギー低減性ヨーグルト」に対する消費者の潜在的期待は高いと考えられる。これら背景をもとに、本研究では、probiotics の中でもとくに腸内環境改善作用が高いと考えられる bifidobacteria を用いたアレルギー低減性発酵乳の開発を目指し、その基盤となる基礎的知見を得るための検討を重ねた。

近年になり、*in vitro*、*in vivo* およびヒト臨床レベルにおいても、probiotics の抗アレルギー作用の実験的確認が蓄積されつつある。しかしながら、免疫調節作用を示す probiotics の作用機序に関しては不明な点が多く、その解明を進めるためには、関与している probiotics の菌体成分を明らかにして行く必要がある。DNA 成分に関しては、乳酸桿菌のゲノム DNA が大腸菌ゲノム DNA と同様に B 細胞を刺激すること、また、その DNA から幾つかの免疫刺激性配列が報告されているが、bifidobacteria ゲノム DNA 起源の免疫刺激性に関する報告は無く、本研究では *Bifidobacterium longum* BB536 から免疫刺激性配列の同定を試みた。その結果、マウス B リンパ球を刺激し、かつ Th1 cytokine である IL-12 誘導能を持つ免疫刺激性配列として ODN BL07 (5' -GCGTCGGTTTCGTTGCTCAC-3') を同定し、ODN BL07 の生理作用は免疫刺激性配列のレセプターである TLR9 を介することを明らかにした。

ODN BL07 を同定した *Bifidobacterium longum* BB536 のヒト臨床試験における花粉症改善作用が示唆され、BB536 の構成成分である ODN BL07 が抗アレルギー作用を示すかどうかは、その作用機序解析の一旦において重要な知見になると考えられた。そこで、本章では ODN BL07 の抗アレルギー作用を *in vitro* および *in vivo* のモデル実験において検討した。

in vitro においては、OVA 感作 BALB/c マウスの脾臓細胞を用いて、IgE 産生抑制作用を検討した。ODN BL07 および BL07S はともに、Total IgE の産生を有意に抑制することが明らかにし、その抗アレルギー作用が示唆された。IFN- γ 、IL-12 および IL-4 を測定した結果、ODN BL07 は有意な Th1 cytokine 誘導値を示したが、IL-4 に関して有意差は認められなかった。この結果から、ODN BL07 の IgE 産生抑制作用は Th1/Th2 balance 以外の作用機序が示唆された。そこで、精製 B リンパ球に対する ODN BL07 の B 細胞に対する直接的な IgE 産生抑制作用を検討した結果、ODN BL07 は有意な IgE 産生抑制作用を示し、B 細胞に対する

ODN BL07 の直接作用が明らかとなった。

*in vivo*においては、ODN BL07S の皮下投与および経口投与での IgE 産生抑制作用を検討した。皮下投与では、BALB/c マウスにコントロール群として、OVA と ODN BL07S (10 μ g/mouse) を 2 回投与し、Th2 偏向のマウスを作成し IgE を測定することで抗アレルギー作用の評価を行った。その結果、ODN 群で有意な IgE 産生抑制作用が確認され、ODN BL07S の皮下投与における抗アレルギー作用が示唆された。経口投与においては、OVA を腹腔内投与した Th2 偏向モデル BALB/c マウスを作成し、ODN BL07S の投与による IgE 産生抑制作用を検討した。その結果、ODN 群でコントロールと比較して有意に低い OVA 特異的 IgE 値を示し、total IgE 値では ODN 群で低下傾向が認められ、経口投与においてもその抗アレルギー作用が示唆された。ODN BL07S による IgE 産生抑制の作用機序を検討するために、皮下および経口投与ともに、脾臓細胞からの cytokine 誘導試験を実施した。皮下投与においては、Th2 cytokine が ODN BL07S の投与により有意に低値を示し、Th2 反応の抑制が IgE 産生を抑制している機序となっていることが示唆された。また、経口投与においては、Th1 cytokine である IFN- γ の有意な誘導と、Th2 cytokine の低下傾向が認められ、Th1/Th2 balance が改善していることが示唆された。近年、抗アレルギー作用への関与が示唆されている制御性 cytokine である IL-10 および TGF- β に関しては、皮下ならびに経口投与においてもコントロールとの差は認められず、本研究での ODN BL07 の抗アレルギー作用にはこれら制御性 T 細胞から産生される調節性因子は関与していないことが示唆された。

本研究と並行して、ODN BL07 を同定した *Bifidobacterium longum* BB536 に関する免疫調節作用の検討がなされた。OVA 感作マウスを用いた *in vitro* 試験においては、BB536 菌体は脾臓細胞から産生される total IgE と Th2 cytokine である IL-4 を抑制した。また、BB536 菌体の刺激により未成熟なマウス骨髓由

来樹状細胞 (BMDC) は成熟化され、この BMDC を OVA 感作マウスの脾臓 T 細胞と共培養した場合には、T 細胞から産生される IL-4 が抑制された。OVA 感作マウスへの BB536 投与実験では、血中の total IgE および IgG1 濃度上昇の抑制が確認された。以上の結果から、マウスにおいて BB536 は樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞を介して、IgE および Th2 cytokine を抑制した抗アレルギー作用が示唆されている (unpublished results)。また、2004、2005 年のスギ花粉飛散シーズンに、*Bifidobacterium longum* BB536 の摂取による花粉症改善効果について検討したところ、両年において症状の緩和効果や血中マーカーの改善が認められた [62-63]。これら BB536 菌体が示す抗アレルギー作用の作用機序として、本研究結果は、そのゲノム DNA 成分が関与している可能性を示唆するものである。とくに、経口投与において、probiotics 菌体成分である DNA 成分が抗アレルギー作用を示すことが明らかになったことにより、これまで菌体レベルでしか論ずることが出来なかった probiotics の抗アレルギー作用を、物質論的な研究レベルまで高めることが出来たことは、これからの probiotics の抗アレルギー作用の作用機序解析を加速させるものと考えられる。これら研究成果の蓄積がなされた *Bifidobacterium longum* BB536 を使用した発酵乳製品が発売されている。



謝 辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 B(2), No. 15380183）により遂行することができた。

本研究を遂行するにあたりご協力頂きました，森永乳業株式会社，明治乳業株式会社およびタカナシ乳業株式会社の皆様に感謝致します。とくに，森永乳業株式会社より受託研究員として関連研究に従事された高橋典俊博士の努力により，予想以上の研究成果が得られ，当初 4 年計画の研究プロジェクトを 1 年短縮し終了することができた。また，本研究を遂行する上で，お世話になった東北大学大学院農学研究科 動物資源化学研究室 院生諸氏（下里剛士 氏（現博士），遠野雅徳 氏，加藤真一郎 氏，イリアン 氏）ならびに川井 泰 博士，西村順子技職および本研究科 機能形態学研究室 山口高弘教授，麻生久助教授ならびに渡辺康一博士に深く感謝致します。

5) 参考論文

- [1] 日経バイオビジネス別冊 フードサイエンス&ビジネス 機能性食品の開発と食の安全 39-46 日経 BP 社
- [2] 財団法人日本健康・栄養食品協会ホームページ <http://www.jhnfa.org/>
- [3] 長寿の研究 E. メチニコフ (財)日本ビフィズス菌センター編 幸書房
- [4] 発酵乳の科学 乳酸菌の機能と保健効果 細野明義編 アイ・ケイ・コーポレーション
- [5] Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 1989;66:365-78.
- [6] Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada, 2002.
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
- [7] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med J.*, 1989;299:1259-1260.
- [8] Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Bjorksten B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr.*, 1997;86:956-61.
- [9] Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001;107:129-34.
- [10] Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997;99:179-85.
- [11] Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2001;357:1076-79.
- [12] 榎本雅夫, 嶽良博, 嶋田貴志, 河合康雄, 山本哲郎, 白川太郎, LFK (FK-23 菌抽出物) を配合する顆粒食品のスギ花粉症に対する臨床効果, 耳鼻咽喉科展望, 2000;43:248-252.

- [13] Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Yamamoto N, Kagata H, Oh-Ida M, Takeuchi H, Fujiwara S. Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on symptoms of Japanese cedar pollen allergy: a randomized placebo-controlled trial. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005;69:1652-60.
- [14] Fujiwara D, Wakabayashi H, Watanabe H, Nishida S, Iino H. A double-blind trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy. *Allergol. Int.*, 2005;54:143-149.
- [15] Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S, Kaminogawa S. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1998;115:278-87.
- [16] Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J. Dairy Sci.*, 1998;81:48-53.
- [17] Ishida Y, Bandou I, Kanzato H, Yamamoto N. Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003;67:952-7.
- [18] Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004;135:205-215.
- [19] Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelsen KF. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J. Pediatr.*, 2004;145:612-6.
- [20] プロバイオティクスとバイオジェニクス 伊藤喜久治編著 エヌ・ティー・エス
- [21] Kitazawa H, Yamaguchi T, Itoh T. B-cell mitogen produced by slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* isolated from ropy sour milk, viili. *J. Dairy Sci.*, 1993;76:1514-1519.

- [22] Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003;10:259-266.
- [23] Pena JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell. Microbiol.*, 2003;5:277-285.
- [24] Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995;374:546-549.
- [25] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002;20:709-60.
- [26] Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001;65:149-62.
- [27] Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003;85:11-21.
- [28] Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, Katoh S, Morita H, He F, Hosoda M, Saito T. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell. Microbiol.*, 2005;7:403-14.
- [29] Shimosato T, Kimura T, Tohno M, Iliev ID, Katoh S, Ito Y, Kawai Y, Sasaki T, Saito T, Kitazawa H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell. Microbiol.*, 2006;8:485-95.
- [30] 榎本雅夫, 清水(肖)金忠, 島津伸一郎, ヨーグルト・乳酸菌飲料摂取によるア

- [22] Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2003;10:259-266.
- [23] Pena JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell. Microbiol.*, 2003;5:277-285.
- [24] Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995;374:546-549.
- [25] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002;20:709-60.
- [26] Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001;65:149-62.
- [27] Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003;85:11-21.
- [28] Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, Katoh S, Morita H, He F, Hosoda M, Saito T. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell. Microbiol.*, 2005;7:403-14.
- [29] Shimosato T, Kimura T, Tohno M, Iliev ID, Katoh S, Ito Y, Kawai Y, Sasaki T, Saito T, Kitazawa H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell. Microbiol.*, 2006;8:485-95.
- [30] 榎本雅夫, 清水（肖）金忠, 島津伸一郎, ヨーグルト・乳酸菌飲料摂取によるア

アレルギーの発症抑制—疫学調査から—, アレルギー, 2006;印刷中.

- [31] Tanaka H, Doesburg K, Iwasaki T, Mierau I. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci.*, 1999;82:2530–2535.
- [32] Nakao A, Kasai M, Kumano K, Nakajima H, Kurasawa K, Iwamoto I. High-dose oral tolerance prevents antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Int. Immunol.*, 1998;10:387-94.
- [33] Sato Y, Akiyama H, Suganuma H, Watanabe T, Nagaoka MH, Inakuma T, Goda Y, Maitani T. The feeding of beta-carotene down-regulates serum IgE levels and inhibits the type I allergic response in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 2004;27:978-84.
- [34] Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotic in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 2004;126:520-528.
- [35] Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, Matteuzzi D, Campieri M. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA : IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003;38:165-172.
- [36] Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001;65:149-62.
- [37] Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003;85:11-21.
- [38] Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, Katoh S, Morita H, He F, Hosoda M, Saito T. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell. Microbiol.*, 2005;7:403-14.

- [39] Shimosato T, Kimura T, Tohno M, Iliev ID, Katoh S, Ito Y, Kawai Y, Sasaki T, Saito T, Kitazawa H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell. Microbiol.*, 2006;8:485-95.
- [40] http://gib.genes.nig.ac.jp/single/main.php?spid=Blon_NCC2705
- [41] Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis HL. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol.*, 1998;6:23-27.
- [42] Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.*, 1998;16
- [43] Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004;4:249-258
- [44] Shimosato T, Kimura T, Tohno M, Iliev ID, Katoh S, Ito Y, Kawai Y, Sasaki T, Saito T, Kitazawa H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell. Microbiol.*, 2006;8:485-95.
- [45] Kandimalla ER, Bhagat L, Cong YP, Pandey RK, Yu D, Zhao Q, Agrawal S. Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003;306:948-953.
- [46] Liu N, Ohnishi N, Ni L, Akira S, Bacon KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat. Immunol.*, 2003;4:687-693.
- [47] Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.*, 1996;157:1840-5.
- [48] Zhu FG, Kandimalla ER, Yu D, Tang JX, Agrawal S. Modulation of ovalbumin-induced Th2 responses by second-generation immunomodulatory oligonucleotides in mice. *Int.*

Immunopharmacol., 2004;4:851-62.

- [49] Wing K, Suri-Payer E, Rudin A. CD4⁺CD25⁺-regulatory T cells from mouse to man. *Scand. J. Immunol.*, 2005;62:1-15.
- [50] Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005;116:949-959.
- [51] Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:271-83.
- [52] Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*. 2006;117:433-42.
- [53] Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require Th1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1999;104:1258-64.
- [54] Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004;173:4433-42.
- [55] プロバイオティクスとバイオジェニクス 伊藤喜久治編著 エヌ・ティー・エス
- [56] Kitagaki K, Businga TR, Kline, JN, Oral administration of CpG-ODNs suppresses antigen-induced asthma in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006;143:249-259.
- [57] Kimoto H, Mizumachi K, Okamoto T, Kurisaki J. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol. Immunol.*, 2004;48:75-82.
- [58] Ohno H, Tsunemine S, Isa Y, Shimakawa M, Yamamura H. Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* G9-1 suppresses total and antigen specific immunoglobulin E production in mice. *Biol Pharm Bull.*, 2005;28:1462-1466.
- [59] 榎本雅夫, 嶽良博, 嶋田貴志, 河合康雄, 山本哲郎, 白川太郎, LFK (FK-23 菌

抽出物)を配合する顆粒食品のスギ花粉症に対する臨床効果, 耳鼻咽喉科展望, 2000;43:248-252.

- [60] Ishida Y, Nakamura F, Kanzato H, Sawada D, Yamamoto N, Kagata H, Oh-Ida M, Takeuchi H, Fujiwara S. Effect of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 on symptoms of Japanese cedar pollen allergy: a randomized placebo-controlled trial. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005;69:1652-60.
- [61] Fujiwara D, Wakabayashi H, Watanabe H, Nishida S, Iino H. A double-blind trial of *Lactobacillus paracasei* strain KW3110 administration for immunomodulation in patients with pollen allergy. *Allergol. Int.*, 2005;54:143-149.
- [62] Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Iwatsuki K, Kokubo S, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T. Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2006;16:86-93.
- [63] Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, Takahashi N, Odamaki T, Iwabuchi N, Iwatsuki K, Togashi H, Enomoto K, Enomoto T. Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clin. Exp. Allergy*, 2006;36:1425-1435.

【4】研 究 成 果 公 表 論 文 等

- 1) 原 著 論 文
- 2) 総 説
- 3) 学 会 発 表・招 待 講 演
- 4) 報 道
- 5) 特 許
- 6) 商 品 開 発

1) 原 著 論 文

1. Katoh, S., **H. Kitazawa**, T. Shimosato, M. Tohno, Y. Kawai, T. Saito; Cloning and characterization of swine Interleukin-17, preferentially expressed in the intestines. *J. Interferon Cytokine Res.*, 24, 553-559 (2004).
2. Shimosato, T., **H. Kitazawa**, M. Tohno, S. Katoh, Y. Kawai and T. Saito; Development of immune assay system for both CpG and non-CpG DNA from lactic acid bacteria using a transfectant of swine Toll-like receptor 9. *Anim. Sci. J.*, 75, 377-382 (2004).
3. Shimosato, T., **H. Kitazawa**, S. Katoh, M. Tohno, I.D. Iliev, C. Nagasawa, T. Kimura, Y. Kawai and T. Saito; Augmentation of TH-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326, 782-787 (2005).
4. Iliev, I.D., **H. Kitazawa**, T. Shimosato, S. Katoh, H. Morita, F. He, M. Hosoda and T. Saito; Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cellular Microbiology*, 7, 403-414 (2005).
5. Shimosato, T., M. Tohno, **H. Kitazawa**, S. Katoha, K. Watanabe, Y. Kawaia, H. Aso, T. Yamaguchi and T. Saito; Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol. Lett.*, 98, 833-89 (2005).
6. Tohno, M., T. Shimosato, **H. Kitazawa**, S. Katoh, I. D. Iliev, T. Kimura, Y. Kawai, K. Watanabe, H. Aso, T. Yamaguchi and T. Saito; Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., 330, 547-554 (2005).

7. Tohno, M., **H. Kitazawa**, T. Shimosato, M. Matsumoto, S. Katoh, Y. Kawai and T. Saito; A swine Toll-like receptor 2-expressing transfectant as a potential primary screening system for immunobiotic microorganisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 44, 283-288 (2005).

8. Shimosato, T., T. Kimura, M. Tohno, I.D. Iliev, S. Katoh, Y. Ito, Y. Kawai, T. Sasaki, T. Saito and **H. Kitazawa**; Strong immunostimulatory activity of AToligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cellular Microbiology*, 8, 485-495 (2006).

9. Takahashi, N., **H. Kitazawa**, T. Shimosato, N. Iwabuchi, J.Z. Xiao, K. Iwatsuki, S. Kokubo and T. Saito; An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 46, 461-469 (2006).

10. Takahashi, N., **H. Kitazawa**, N. Iwabuchi, J. Z. Xiao, K. Miyaji, K. Iwatsuki and T. Saito; Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model. *Clin. Exp. Immunol.*, 145, 130-138 (2006).

11. Takahashi, N., **H. Kitazawa**, N. Iwabuchi, J. Z. Xiao, K. Miyaji, K. Iwatsuki and T. Saito; Oral administration of an immunostimulatory DNA sequence from *Bifidobacterium longum* improves Th1/Th2 balance in a murine model. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2013-2017 (2006).

12. Tohno, M., T. Shimosato, M. Mouea, H. Aso, K. Watanabe, Y. Kawai, T. Yamaguchi, T. Saito and **H. Kitazawa**; Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine. *Vet. Res.*, 37, 791-812 (2006).

13. Tohno, M., T. Shimazu, W. Ueda, D. Anzawa, H. Aso, J. Nishimura, Y. Kawai, Y. Saito, T. Saito and H. Kitazawa; Molecular cloning of porcine RP105/MD-1 involved in recognition of extracellular phosphopolysaccharides from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. *Mol. Immunol.*, 44, 2566-2577 (2007).

14. Tohno, M., T. Shimosato, Y. Kawai, H. Aso, S. Ikegami, N. Taketomo, T. Saito and H. Kitazawa; An advanced molecular immunoassay system for immunobiotic lactic acid bacteria using a transfectant of Toll-like receptor 2. *Anim. Sci. J.*, 78, 195-205 (2007).

3) 学 会 発 表・招 待 講 演

[学会発表 国内]

1. 下里剛士, 北澤春樹, 加藤真一郎, 遠野雅徳, 永沢千穂, 木村俊朗, 川井 泰, 齋藤忠夫; 免疫活性 AT オリゴヌクレオチドの Toll 様受容体 9 を介する Th-1 系免疫応答の誘導 日本畜産学会 第 104 回大会 講演要旨集, p.175, 2005.
2. 木村俊朗, 北澤春樹, 下里剛士, 伊藤喜之, 加藤真一郎, 遠野雅徳, 永沢千穂, 川井泰, 佐々木隆, 齋藤忠夫; 新規免疫活性 AT オリゴヌクレオチドの *Lactobacillus gasseri* OLL2716 ゲノム DNA からの探索 日本畜産学会 第 104 回大会 講演要旨集, p.175, 2005.
3. 遠野雅徳, 北澤春樹, 下里剛士, 加藤真一郎, 木村俊朗, 川井泰, 渡邊康一, 麻生久, 山口高弘, 齋藤忠夫; ヒトモデルとしてのブタ腸管関連リンパ組織における Toll-like receptor (TLR) 2 の発現解析 日本畜産学会 第 104 回大会 講演要旨集, p.175, 2005.
4. 高橋典俊, 北澤春樹, 岩淵紀介, 清水(肖)金忠, 岩附慧二, 小久保貞之, 齋藤忠夫; *Bifidobacterium longum* BB536 ゲノム由来 ISS-ODN の抗アレルギー作用, 2005 年度 日本乳酸菌学会大会, 東京, 2005.
5. Iliyan Iliev, Haruki Kitazawa, Takeshi Shimosato, Shinichiro Katoh, Hirotsugu Morita, He Fang, Masataka Hosoda, Yasushi Kawai and Tadao Saito; Novel oligodeoxynucleotide in the genomic DNA of *Lactobacillus rhamnosus* GG elicits strong immunostimulation. 日本農芸化学会 2005 年度大会 講演要旨集, p.112, 札幌, 2005 (学会トピックスに採択).
6. 下里剛士, 北澤春樹, 遠野雅徳, 伊藤喜之, 川井泰, 佐々木隆, 齋藤忠夫; プロバイオティック乳酸菌由来, 新規免疫刺激性 DNA の Toll 様受容体 9 を介

する Th-1 系免疫応答の誘導とその構造特性. 日本食品免疫学会 第 1 回学術集会, 東京, 2005.

7. 遠野雅徳, 北澤春樹, 下里剛士, 川井泰, 渡邊康一, 麻生久, 山口高弘, 齋藤忠夫; ヒトモデルとしてのブタ腸管関連リンパ組織における Toll 様受容体 2 および 9 の発現解析. 日本食品免疫学会 第 1 回学術集会, 東京, 2005.

8. 遠野雅徳, 北澤春樹; ブタ腸管関連リンパ組織における Toll-like receptor(TLR)2 および 9 の発現とその機能解析. 第 141 回日本獣医学会学術集会, 講演要旨集, p.226, つくば, 2006. (ベストポスター賞受賞).

9. 馬上真之, 遠野雅徳, 下里剛士, 麻生久, 川井泰, 齋藤忠夫, 北澤春樹; ブタ腸管上皮細胞 (PIE) における Toll 様受容体 (TLR) ファミリーの機構発現. 日本畜産学会 第 106 回大会 講演要旨集, p.146, 2006.

10. 遠野雅徳, 下里剛士, 川井泰, 齋藤忠夫, 池上秀二, 北澤春樹; プロバイオティクスを認識するブタ TLR2 強制発現細胞による新規分子免疫評価系の構築. 日本畜産学会 第 106 回大会 講演要旨集, p.9, 2006. (優秀発表賞受賞)

[学会発表 海外]

1. Kitazawa H., T. Shimosato, S. Katoh, M. Tohno, Y. Kawai and T. Saito; Immunostimulatory activities of a novel AT oligonucleotide from "Immunobiotic" *Lactobacillus gasseri* on swine peyer's patch cells. ADSA-ASAS-PSA Joint Meeting, St. Louis, MO, USA, 2004.

2. Shimosato T., H. Kitazawa, M. Tohno, S. Katoh, Y. Kawai and T. Saito; AT oligonucleotide from "Immunobiotic" *Lactobacillus gasseri* augments immune response via Toll-like receptor 9 signaling. ADSA-ASAS-PSA Joint Meeting, St. Louis, MO, USA, 2004.

3. Tohno M., T. Shimosato, Y. Kawai, T. Saito and H. Kitazawa; Development of a novel immunoassay system for immunobiotics that

modulate intestinal immunity through Toll-like receptor 2. ADSA-ASAS joint meeting, Minneapolis, MN, USA, 2006. (Graduate student competition, finalist)

4. Kitazawa H., M. Tohno, T. Shimosato, Y. Kawai, and T. Saito; Immunobiotic lactic acid bacteria induce immune responses in immature gut-associated lymphoid tissues via Toll-like receptors 2 and 9. ADSA-ASAS joint meeting, Minneapolis, MN, USA, 2006.

〔招待講演〕

1. 北澤春樹, 齋藤忠夫; イムノバイオティック乳酸菌の Toll 様受容体を介する腸管免疫調節機構の解明. 日本乳酸菌学会 2004 年度大会シンポジウム, 仙台, 2004 年 7 月 9 日.

2. 齋藤忠夫; プロバイオティクスの示す持続的免疫修飾性、抗菌性および乳糖分解性発現に重要な腸管付着性. 日本食品免疫学会 第 2 回学術大会シンポジウム, 東京, 2005 年 11 月 9 日.

3. Kitazawa, H., T. Shimosato, M. Tohno and T. Saito; Swine intestinal immunity via Toll-like receptors and its advanced application to Food immunology. Session A. Immunology and animal disease control, International Symposium on Recent Advances in Animal Science, Sendai, Nov.17, 2005.

4. 北澤春樹; イムノバイオティクスからの新規免疫刺激性 DNA の発見と分子免疫評価システムの構築, 第 171 回酵母細胞研究会例会, 千葉, 2005 年 11 月 25 日.

5. Kitazawa, H.; Immune responses of Immunobiotics and Immunogenics via Toll-like receptors and their advanced application to Food immunology. 2nd International Bio-microcosmos Workshop, Sapporo, Feb. 2, 2006.

6.北澤春樹；パターン認識受容体を介したイムノバイオティクスによる腸管免疫調節機構，第 141 回日本獣医学会学術集会 微生物学分科会 シンポジウム「異物認識の多様性と微生物感染」，講演要旨集，p.145，つくば，2006 年 3 月 21 日．

7.北澤春樹；イムノバイオティクスからの新規免疫調節因子の発見とその分子免疫評価系の構築，日本畜産学会賞受賞講演，講演要旨集，p.3，福岡，2006 年 3 月 29 日．

4) 報 道

1. 「◆農芸化学会◆森永乳業、BB536 菌の抗アレルギー活性本体を発表」日経バイオテクホームページ(2005 年 3 月 30 日).

Biotechnology Japan ホームページ内情報より掲載

(<http://biotech.nikkeibp.co.jp/bionewsn/detail.jsp?newsid=&id=20029423>)

2. 「東北大齋藤教授ら、乳酸菌の TLR 刺激 DNA 配列を森乳 BB536、タカナシ LGG、明乳 LG21 で確認」日経バイオテクホームページ(2005 年 11 月 15 日).

Biotechnology Japan ホームページ内情報より掲載

(<http://biotech.nikkeibp.co.jp/bionewsn/detail.jsp?newsid=SPC2005111535558&id=0>)

5) 特 許

1. 免疫賦活剤 (特開2006-232790)
2. A Tオリゴヌクレオチドを有効成分とする免疫応答増強性薬剤及び食品成分 (特開 2006-223110)
3. オリゴデオキシヌクレオチドおよびこれを利用する免疫修飾剤 (特開 2006-325540)

6) 商 品 開 発

1. 抗ブタToll-like receptor 2ポリクローナル抗体

2. 抗ブタ Toll-like receptor 9 ポリクローナル抗体

(1, 2とも, コスモ・バイオ株式会社より販売(平成19年3月発売))

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。